4
ИЮЛЬ–АВГУСТ
Том 102
2025

ЖУРНАЛ МИКРОБИОЛОГИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ и ИММУНОБИОЛОГИИ

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

JOURNAL OF MICROBIOLOGY EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY

4
JULY–AUGUST
Volume 102
2025

УЧРЕДИТЕЛИ:
ФБУН ЦНИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ РОСПОТРЕБНАДЗОРА
ВСЕРОССИЙСКОЕ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО ЭПИДЕМИОЛОГОВ, МИКРОБИОЛОГОВ И ПАРАЗИТОЛОГОВ

Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии

(Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii)

Двухмесячный научно-практический журнал

Основан в 1924 г.

Рецензируемый «Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии» рассматривает актуальные проблемы мировой науки и обеспечивает синтез новейших результатов исследований в области микробиологии, вирусологии, эпидемиологии, вакцинологии, иммунобиологии, профилактики и контроля инфекционных заболеваний. Междисциплинарный подход дает возможность интеграции передовых научных знаний смежных специальностей, широкого видения проблем фундаментальной и прикладной инфектологии, а также комплексного подхода к созданию биомедицинских технологий. К публикации принимаются научные труды российских и зарубежных исследователей, лекции, а также методические материалы и законодательные документы в области сохранения эпидемиологического благополучия населения.
Журнал входит в базу данных SCOPUS и рекомендованный ВАК «Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук» по специальностям:
1.5.10. Вирусология (медицинские и биологические науки);
1.5.11. Микробиология (медицинские и биологические науки);
3.2.2. Эпидемиология (медицинские и биологические науки);
3.2.7. Аллергология и иммунология (медицинские и биологические науки).
В соответствии с рекомендациями ВАК (письмо ВАК от 06.12.2022 № 02-1198), журнал относится к категории К1 как издание, входящее в базы данных SCOPUS и RSCI.

4

ИЮЛЬ – АВГУСТ

ТОМ 102

2025

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

Свидетельство ПИ № ФС77-75442

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

DOI prefix: 10.36233

Журнал открытого доступа, не берущий плату за публикации.

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

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

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

Журнал представлен в международных базах данных и информационно-справочных системах:
RSCI; RUSMED; SCOPUS; DOAJ; Ulrich's Periodicals Directory, ROAD; EBSCO Publishing (на платформе EBSCOhost); ROAD; HYPERLINK; OPENALEX; FATCAT; ZEITSCHRIFTEN DATENBANK; CrossRef; Dimensions.

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

Полные тексты статей журнала доступны на сайтах:
https://microbiol.crie.ru;
https://www.elibrary.ru;
https://www.cyberleninka.ru;
https://www.rucont.ru;
https://www.ebsco.com;
https://www.doaj.org;
http://www.elsevier.com

УЧРЕДИТЕЛИ:

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
www.crie.ru

Всероссийское научно-практическое общество эпидемиологов, микробиологов и паразитологов
http://nposmp.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 60×90 1/8. Тираж 158 экз.
Усл.-печ. л. 17,5.

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

16+

© ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, 2025

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

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

Заместители главного редактора

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

Ответственный секретарь

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Российские члены редакционной коллегии

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Козлов Р.С., д.м.н., проф., 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

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

Иностранные члены редакционной коллегии

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

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

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

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

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

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

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

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

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

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

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

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

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

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

JOURNAL of MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY

(Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii)

Bimonthly scientific and practical journal

Founded in 1924

Peer-reviewed Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology is dedicated to the most significant issues of world science and provides a synthesis of the cutting edge research in the field of microbiology, virology, epidemiology, vaccinology, immunobiology, prevention of infectious diseases. The interdisciplinary approach enables the reader to integrate advanced scientific knowledge of related specialties, to receive a broad vision of the problems of fundamental and applied infectology and a comprehensive approach to creating innovative biomedical technologies. The Journal welcomes Russian and foreign original research articles, reviews, brief reports, mini-reviews, opinions and other special featured articles as well as lectures, methodological materials related to its profile. The Journal is indexed in the SCOPUS database and admitted to the Index of leading peer-reviewed scientific journals intended for publication of key research results of MD Theses, as recommended by the Higher Attestation Commission of the Russian Ministry of Education and Science:
1.5.10. Virology (medical and biological sciences);
1.5.11. Microbiology (medical and biological sciences);
3.2.2. Epidemiology (medical and biological sciences);
3.2.7. Clinical immunology, Allergology (medical and sciences).
In accordance with the recommendations of the Higher Attestation Commission (letter of the Higher Attestation Commission dated December 06, 2022 No. 02-1198), the Journal belongs to the K1 category, as a publication included in the SCOPUS and RSCI databases.

4

JULY – AUGUST

VOLUME 102

2025

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

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

DOI prefix: 10.36233

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

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

The CrossMark service is used.

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

The Journal is indexed by the following abstracting and indexing services:
RSCI; RUSMED; SCOPUS; DOAJ; Ulrich's Periodicals Directory, ROAD; EBSCO Publishing (на платформе EBSCOhost); ROAD; HYPERLINK; OPENALEX; FATCAT; ZEITSCHRIFTEN DATENBANK; CrossRef; Dimensions.

Index for subscription to the printed version of the journal:

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

Full texts of issues of the journal are available:
https://microbiol.crie.ru;
https://www.elibrary.ru;
https://www.cyberleninka.ru;
https://www.rucont.ru;
https://www.ebsco.com;
https://www.doaj.org;
http://www.elsevier.com

FOUNDERS:
Central Research Institute for Epidemiology
www.crie.ru

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

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

EDITORIAL OFFICE:
5A, Maly Kazenny per., Moscow, 105064, Russia.
Phone: +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'yedinennyy poligraficheskiy kompleks Ltd.115114, 7C2, Derbenevskaya emb., Moscow, Russian Federation.

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

© Central Research Institute for Epidemiology, 2025

EDITOR-IN-CHIEF

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

Deputy Editors

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

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

Executive Secretary

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

EDITORIAL BOARD

Russian members of the Editorial Board

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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. Kutyrev, 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), Martsinovsky Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector-Borne Diseases, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

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

Mikhail I. Mikhaylov, RAS 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 Insitutes of Health, Bethesda, USA

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

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

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

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

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

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

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

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

EDITORIAL COUNCIL

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

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

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

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

Alexandra A. Nikonova, Cand. Sci. (Biology), 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

НАУКА И ПРАКТИКА

Замотаева Т.Л., Дедяева Е.А., Михеева О.О., Пика М.И., Черкашин Е.А., Черкашина А.С., Акимкин В.Г.
Получение и характеристика химерных Bst-подобных полимераз и их применение в изотермической амплификации в сочетании с экспресс-методами выделения РНК на примере вируса эпидемического паротита 391

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Показеева Ю.Н., Семейкина Л.М., Яковлев А.А., Тимченко Н.Ф., Макаренкова И.Д., Щелканов М.Ю.
Характеристика возбудителей сальмонеллёзов, циркулирующих в Приморском крае до и во время пандемии COVID-19 404

Бородай Н.В., Несговорова А.В., Мендыгалиева А.К., Колоскова А.Ю., Удовиченко С.К., Зарубин Н.А., Каргашин С.А., Гусев Е.А., Батурин А.А., Хабарова И.А., Путинцева Е.В., Топорков А.В.
Итоги рекогносцировочного эпизоотологического мониторинга лихорадки Западного Нила на отдельных территориях европейской части России и Урала в 2024 году 413

Лаповок И.А., Кириченко А.А., Шлыкова А.В., Киреев Д.Е., Попова А.А., Покровская А.В.
Анализ генетических вариантов и лекарственной устойчивости ВИЧ-1 среди мужчин с рискованным сексуальным поведением, граждан Кубы, проживающих в Москве в 2022–2024 годах 425

Макарова М.А., Бальдэ Р., Кафтырева Л.А., Матвеева З.Н., Жамборова С.Х.
Этиологическая структура острых кишечных инфекций по результатам экстерриториального мониторинга 436

Протасова И.Н., Фельдблюм И.В., Бахарева Н.В., Зиновьева Л.В., Кулик Е.В.
Резистентность к антимикробным препаратам штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных у детей на фоне иммунизации 13-валентной конъюгированной вакциной 445

Заднова С.П., Плеханов Н.А., Сергутин Д.А., Челдышова Н.Б., Федоров А.В., Краснов Я.М.
Анализ генов антифаговых систем нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор 456

Старкова Д.А., Гладышев Н.С., Полев Д.Е., Саитова А.Т., Глазунова К.А., Егорова С.А., Сварваль А.В.
Детерминанты резистентности к левофлоксацину и метронидазолу российских клинических изолятов *Helicobacter pylori* по результатам полногеномного секвенирования 465

Косилова И.С., Домотенко Л.В., Храмов М.В.
Стабилизация растворов тигециклина при тестировании чувствительности микроорганизмов методом микроразведений в бульоне 474

ОБЗОРЫ

Карпенко Л.И., Рудометова Н.Б., Низоленко Л.Ф., Локтев В.Б.
Использование метода нейтрализации псевдовирусов для поиска новых антивирусных препаратов 482

Цыганова М.И., Новиков Д.В., Новиков В.В., Караулов А.В.
Биоконъюгация как перспективный метод создания вакцин 495

ЮБИЛЕИ

К 80-летию со дня рождения Олега Ивановича Киселева 507

---

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

CONTENTS

SCIENCE AND PRACTICE

Zamotaeva T.L., Dedyaeva E.A., Mikheeva O.O., Pika M.I., Cherkashin E.A., Cherkashina A.S., Akimkin V.G.
Production and characterization of chimeric Bst-like polymerases and their application in isothermal amplification combined with rapid RNA extraction methods using the example of the mumps virus 391

ORIGINAL RESEARCHES

Pokazeeva Yu.N., Semeykina L.M., Yakovlev A.A., Timchenko N.F., Makarenkova I.D., Shchelkanov M.Yu.
Characteristics of salmonellosis pathogens circulating in Primorsky Krai before and during the COVID-19 pandemic 404

Borodai N.V., Nesgovorova A.V., Mendygalieva A.K., Koloskova A.Yu., Udovichenko S.K., Zarubin N.A., Kargashin S.A., Gusev Ye.A., Baturin A.A., Khabarova I.A., Putintseva E.V., Toporkov A.V.
Results of reconnaissance epizootiological monitoring for West Nile fever in certain regions of European Russia and the Urals in 2024 413

Lapovok I.A., Kirichenko A.A., Shlykova A.V., Kireev D.E., Popova A.A., Pokrovskaya A.V.
Analysis of HIV-1 genetic variants and drug resistance among men with high-risk sexual behavior, Cuban citizens, living in Moscow in 2022–2024 425

Makarova M.A., Balde R., Kaftyreva L.A., Matveeva Z.N., Zhamborova S.Kh.
Etiological structure of acute intestinal infections based on the results of exterritorial monitoring 436

Protasova I.N., Feldblium I.V., Bakhareva N.V., Zinovieva L.V., Kulik E.V.
Antimicrobial resistance of Streptococcus pneumoniae strains isolated from children following immunization with a 13-valent conjugated vaccine 445

Zadnova S.P., Plekhanov N.A., Sergutin D.A., Cheldyshova N.B., Fedorov A.V., Krasnov Ya.M.
Analysis of the gene structure of antiphage systems of non-toxigenic strains of *Vibrio cholerae* O1 biovar El Tor 456

Starkova D.A., Gladyshev N.S., Polev D.E., Saitova A.T., Glazunova K.A., Egorova S.A., Svarval A.V.
Determinants of resistance to levofloxacin and metronidazole in Russian *Helicobacter pylori* clinical isolates based on whole-genome sequencing data 465

Kosilova I.S., Domotenko L.V., Khramov M.V.
Stabilization of tigecycline solutions during susceptibility testing of microorganisms by broth microdilution method 474

REVIEWS

Karpenko L.I., Rudometova N.B., Nizolenko L.F., Loktev V.B.
Application of the pseudovirus-based neutralization assay in the search for new antiviral drugs 482

Tsyganova M.I., Novikov D.V., Novikov V.V., Karaulov A.V.
Bioconjugation as a promising method for vaccine development 495

ANNIVERSARIES

On the 80th anniversary of the birth of Oleg Ivanovich Kiselyov 507

---

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

НАУКА И ПРАКТИКА

Оригинальное исследование
https://doi.org/10.36233/0372-9311-604

Получение и характеристика химерных Bst-подобных полимераз и их применение в изотермической амплификации в сочетании с экспресс-методами выделения РНК на примере вируса эпидемического паротита

Замотаева Т.Л.✉, Дедяева Е.А., Михеева О.О., Пика М.И., Черкашин Е.А., Черкашина А.С., Акимкин В.Г.

Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Аннотация

Введение. Bst-полимераза играет ключевую роль в экспресс-диагностике инфекционных заболеваний благодаря своим уникальным биохимическим свойствам и возможности применения в петлевой изотермической амплификации (LAMP). В литературе описано несколько аналогов Bst-полимеразы, однако данные ферменты не получили широкого применения в молекулярной диагностике.

Цель работы — получение рекомбинантных Bst- и Btlv-полимераз с Sso7d-доменом и тестирование новых возможностей для их применения.

Материалы и методы. Экспрессионные конструкции, несущие ген полимеразы, получали стандартными методами генетической инженерии. Целевой фермент был наработан в клетках *Escherichia coli.* Очистку проводили методами металл-аффинной хроматографии с последующим диализом и концентрированием. РНК-зависимую ДНК-полимеразную (ревертазную) и ДНК-полимеразную активности ферментов определяли с помощью нерадиоактивных методик с флуоресцентной детекцией. Функциональные свойства ферментов оценивали в наборе реагентов «АмплиСенс SARS-CoV-2-IT» и в методике, предназначенной для определения в биологическом материале РНК вируса эпидемического паротита в формате LAMP, совмещённой с обратной транскрипцией.

Результаты. В системе экспрессии на основе клеток *E. coli* получены рекомбинантные химерные ферменты с вытесняющей активностью: Bst_Sso7d, Bst_Sso7d_mut4 и Btlv_Sso7d. Разработанные протоколы культивирования и очистки позволяют получать ферменты в растворимой форме с выходом до 25% от собранной клеточной массы. Функциональное тестирование показало, что в LAMP химерные полимеразы демонстрировали сходную активность с Bst-полимеразой без Sso7d-домена. Вместе с тем полимераза Btlv_Sso7d имела повышенную ревертазную активность и устойчивость к ингибиторам.

Заключение. Полученная химерная полимераза Btlv_Sso7d, благодаря своим улучшенным свойствам, может быть использована в наборах реагентов для диагностики инфекционных заболеваний методом LAMP при использовании методов экспресс-экстракции нуклеиновых кислот.

Ключевые слова: *Bst-полимераза, вытесняющая активность, изотермическая амплификация, устойчивость к ингибиторам*

Источник финансирования. Исследование выполнено за счёт государственного бюджета (федеральный проект «Санитарный щит страны — безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)»).

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

Для цитирования: Замотаева Т.Л., Дедяева Е.А., Михеева О.О., Пика М.И., Черкашин Е.А., Черкашина А.С., Акимкин В.Г. Получение и характеристика химерных Bst-подобных полимераз и их применение в изотермической амплификации в сочетании с экспресс-методами выделения РНК на примере вируса эпидемического паротита. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2025;102(4):391–403.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-604
EDN: https://www.elibrary.ru/TRVYOB

© Замотаева Т.Л., Дедяева Е.А., Михеева О.О., Пика М.И., Черкашин Е.А., Черкашина А.С., Акимкин В.Г., 2025

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-604
SCIENCE AND PRACTICE

Original Study Article
https://doi.org/10.36233/0372-9311-604

Production and characterization of chimeric Bst-like polymerases and their application in isothermal amplification combined with rapid RNA extraction methods using the example of the mumps virus

Tatyana L. Zamotaeva✉, Ekaterina A. Dedyaeva, Olga O. Mikheeva, Maria I. Pika, Evgeny A. Cherkashin, Anna S. Cherkashina, Vasily G. Akimkin

Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Bst polymerase plays a key role in the rapid diagnosis of infectious diseases due to its unique biochemical properties and potential application in loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Several analogs of Bst polymerase have been described in the literature; however, these enzymes have not been widely used in molecular diagnostics.

The aim of the study is to obtain recombinant Bst and Btlv polymerases with the Sso7d domain and to test new possibilities for their application.

Materials and methods. Expression constructs carrying the polymerase gene were obtained using standard genetic engineering methods. The target enzyme was produced in *Escherichia coli* cells. Purification was carried out using metal-affinity chromatography methods followed by dialysis and concentration. RNA-dependent DNA polymerase (reverse transcriptase) and DNA polymerase activities of the enzymes were determined using non-radioactive methods with fluorescent detection. The functional properties of the enzymes were assessed using the Amplisens SARS-CoV-2-IT reagent kit and a method designed for the detection of mumps virus RNA in biological material using the LAMP format combined with reverse transcription.

Results. In the *E. coli*-based expression system, the following recombinant chimeric enzymes with displacing activity have been obtained: Bst_Sso7d, Bst_Sso7d_mut4 and Btlv_Sso7d. The developed cultivation and purification protocols allow for the production of enzymes in soluble form with a yield of up to 25% of the collected cell mass. Functional testing showed that in LAMP, the chimeric polymerases demonstrated similar activity to Bst polymerase without the Sso7d domain. At the same time, the Btlv_Sso7d polymerase exhibited increased reverse transcriptase activity and resistance to inhibitors.

Conclusion. The obtained chimeric polymerase Btlv_Sso7d, due to its improved properties, can be used in reagent kits for the diagnosis of infectious diseases by the LAMP method when using nucleic acid extraction methods.

Keywords: *Bst polymerase, displacing activity, isothermal amplification, inhibitor resistance*

Funding source. The research was funded by the state budget (Federal project “Sanitary shield of the country — safety for health (prevention, detection, response)”).

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

For citation: Zamotaeva T.L., Dedyaeva E.A., Mikheeva O.O., Pika M.I., Cherkashin E.A., Cherkashina A.S., Akimkin V.G. Production and characterization of chimeric Bst-like polymerases and their application in isothermal amplification combined with rapid RNA extraction methods using the example of the mumps virus. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2025;102(4):391–403.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-604
EDN: https://www.elibrary.ru/TRVYOB

Введение

Сокращение времени исследования за счёт применения быстрых тестов является одной из ключевых тенденций в лабораторной диагностике. Этот подход особенно актуален для повышения пропускной способности лаборатории в условиях проведения массовых скринингов и позволяет медицинскому персоналу или эпидемиологам осуществлять диагностику в условиях ограниченности ресурсов, что способствует оказанию своевременной помощи пациентам, быстрому выявлению инфицированных лиц, оперативному расследованию инфекционных вспышек и принятию адекватных эпидемиологических мер, а также предотвращает избыточное назначение профилактических и терапевтических средств. Такие быстрые тесты должны соответствовать определённым требованиям — высокой точности и скорости, простоте и доступности, а также

© Zamotaeva T.L., Dedyaeva E.A., Mikheeva O.O., Pika M.I., Cherkashin E.A., Cherkashina A.S., Akimkin V.G., 2025

обладать высокой стабильностью при хранении и транспортировке [1, 2].

Пандемия коронавируса дала толчок развитию изотермических методов амплификации. Метод петлевой изотермической амплификации (LAMP) [3–5] обладает высокой чувствительностью и специфичностью, важным преимуществом является то, что реакция амплификации проходит при постоянной температуре (без термоциклирования). Это позволяет проводить исследования как в оборудованных клинико-диагностических лабораториях, так и в полевых условиях, где отсутствует специальное лабораторное оборудование. Ключевая роль в дальнейшем развитии наборов реагентов для экспресс-диагностики инфекционных заболеваний методом LAMP принадлежит Bst-полимеразе [6, 7] и её модификациям. Bst-полимераза является большим фрагментом ДНК-полимеразы I (Bst-LF), выделенной из термофильной бактерии *Geobacillus stearothermophilus* (ранее ***B**acillus **s**tearo**t**hermophilus*) [8] и имеющей температурный оптимум 60–70°C. Фермент был выделен J. Stenesh и соавт. в 1972 г. [9], за 4 года до открытия Taq-полимеразы [10, 11]. В дальнейшем как для исследовательских целей, так и в производственных решениях, как правило, стали использоваться рекомбинантные ферменты, в частности Bst-полимераза, клонированная и экспрессированная в клетках бактерий *Escherichia coli*. Бактериальная система на основе клеток *E. coli* отличается простотой и невысокой стоимостью культивирования, высокой скоростью роста микроорганизмов, для неё разработан широкий спектр различных векторов для экспрессии рекомбинантных белков. Для Bst-полимеразы и аналогичных полимераз с вытесняющей активностью из других организмов описаны подходы к клонированию и получению рекомбинантных ферментов в бактериальной системе экспрессии на основе клеток *E. coli* [12–14]. Поскольку на удельную каталитическую активность фермента влияют в том числе особенности нуклеотидной последовательности гена, условия экспрессии, протокол выделения и очистки, все эти этапы требуют оптимизации при получении любого фермента.

Основными подходами к изменению физико-химических характеристик фермента в соответствии с практическими задачами пользователя являются направленный мутагенез и добавление белковых доменов с заданными свойствами [15, 16]. Подобные модификации позволяют повысить выход растворимого фермента при экспрессии в клетках *E. coli*, упростить процесс очистки, а также получить ферменты с улучшенными свойствами: повышенной активностью и термостабильностью, устойчивостью к солям и ингибиторам. Немодифицированная Bst-полимераза обладает недостаточно высокой процессивностью, поскольку в нативном организме участвует в основном в репарации ДНК [17]. Модифицированный фермент обладает гораздо большей процессивностью, которая обусловлена наличием в клетках вспомогательных белков, повышающих стабильность комплекса полимераза–ДНК. Белок Sso7d относится к семейству ДНК-связывающих белков, выделенных из археи рода *Sulfolobus,* стабилен в широком диапазоне температуры и pH. Ряд авторов описывают стратегию слияния полимераз с белком Sso7d или подобными белками (Sto7d, SSB, TBD, DBD) для получения химерных ферментов, обладающих повышенной процессивностью, вытесняющей активностью, термостабильностью и толерантностью к ингибиторам, включая мочевину, цельную кровь и NaCl [18–22].

Термофильные бактерии родственных видов могут вырабатывать разные стратегии выживания, что обусловливается в том числе отличиями в свойствах их ферментов. В этой связи потенциально интересными направлениями становятся клонирование и получение рекомбинантных ДНК-полимераз из новых источников, например, из родственного организма и ближайшего гомолога — термофильной бактерии *Geobacillus thermoleovorans* (ранее ***B**acillus **t**hermo**l**eo**v**orans)* [23, 24].

Целью настоящей работы было получение химерных Bst-подобных полимераз из *G. stearothermophilus,* а также их сравнение с гомологом — Btlv-полимеразой из *G. thermoleovorans* для оценки возможности их применения в реакции изотермической амплификации в сочетании с экспресс-методами выделения РНК.

Материалы и методы

Получение генов Bst_Sso7d, Bst_Sso7d_mut4, Btlv_Sso7d

Нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность Btlv-полимеразы из *G. thermoleovorans*, получали методом сборки из длинных перекрывающихся праймеров — «методом лесенки» [25]. На концах нуклеотидной последовательности были введены сайты рестрикции: NdeI — на 5'-конце и XhoI — на 3'-конце для последующего переклонирования в экспрессионный вектор pET16b+. В результате был получен экспрессионный вектор pET16-Btlv-Nhis. Правильность нуклеотидной последовательности клонированного гена подтверждали методом секвенирования.

В качестве источников генов *Bst* и *Bst_mut4* использовали плазмиды, полученные ранее в лаборатории: pET16_Bst и pET16_Bst_NHis_m4 соответственно [7, 26]. Матрицей для амплификации гена *Sso7d* также служила ранее полученная конструкция pPSS, содержащая ген *Sso7d* дикого типа.

Для получения генов химерных ферментов проводили амплификацию гена целевого фермента

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-604

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованные для клонирования генов

Матрица	Имя	Последовательность 5'-3'	ПЦР2
		Bst_Sso7d	
pET16_Bst	BstF	gaaaggaggaggagctctaacatctgcggaaggcgaaaaaccg	
	BstR	agtctcgagttatttcgcatcataccagg	v
pPSS	SsoF	tcgtcatatggcgaccgtgaagttcaagtataaag	v
	SsoR	agatgttagagctcctcctcctttcttctgtttttccag	
		Bst_Sso7d_mut4	
pET16_Bst_NHis_m4	BstF	gaaaggaggaggagctctaacatctgcggaaggcgaaaaaccg	
	BstR	agtctcgagttatttcgcatcataccagg	v
pPSS	SsoF	tcgtcatatggcgaccgtgaagttcaagtataaag	v
	SsoR	agatgttagagctcctcctcctttcttctgtttttccag	
		Btlv_Sso7d	
pET16-Btlv-Nhis	BtlvF	gaaaggaggaggagctctaacatctccgtcttctgaggaagaaaagcc	
	BtlvR	aagtctcgagttatttcgcatcataccaagtagaaccgtagtg	v
pPSS	SsoF	tcgtcatatggcgaccgtgaagttcaagtataaag	v
	SsoR	agatgttagagctcctcctcctttcttctgtttttccag	

и гена ДНК-связывающего домена *Sso7d*. Полученные ампликоны были выделены и очищены из геля и лигированы между собой с использованием фланкирующих праймеров (**табл. 1**).

Для получения выступающих А-концов очищенный ампликон инкубировали 30 мин при 72°С в присутствии Taq-полимеразы и смеси дезоксинуклеотидов dNTPs. Целевой продукт затем был клонирован в вектор pGEM-T («Promega»). Наличие целевой последовательности и её корректность подтверждали с помощью секвенирования методом Сэнгера.

Получение экспрессионных плазмидных векторов, содержащих гены Bst_Sso7d, Bst_Sso7d_mut4, Btlv_Sso7d

Плазмидную ДНК, содержащую ген химерного фермента, обрабатывали эндонуклеазами рестрикции NdeI и XhoI и полученный продукт рестрикции клонировали в плазмидный вектор pET16b+, предварительно обработанный теми же эндонуклеазами рестрикции. В результате были получены экспрессионные векторы, содержащие гены, которые кодируют следующие гибридные белки: Bst_Sso7d с молекулярной массой 75 кДа, Bst_Sso7d_mut4 с молекулярной массой 75,2 кДа и Btlv_Sso7d с молекулярной массой 75 кДа. Правильность нуклеотидной последовательности клонированных генов была подтверждена секвенированием.

Подбор штаммов E. coli для экспрессии генов Bst_Sso7d, Bst_Sso7d_mut4 и Btlv_Sso7d

В качестве штаммов-носителей для созданных экспрессионных векторов pET16-Bst_Sso7d, pET16-Bst_Sso7d_mut4 и pET16-Btlv_Sso7d использовали штаммы *E. coli* ER2566, BL21de3 pLys и Rosetta De3. Трансформированные клетки высевали на среду LB (1% бакто-триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl) с агаром, содержащим 100 мкг/мл ампициллина для клеток ER2566 и 20 мкг/мл хлорамфеникола для клеток BL21 (DE3) pLys и Rosetta (DE3), и выращивали в течение 16 ч при 37°С для получения отдельных колоний. Затем 7–8 колоний переносили в 100 мл среды LB с 100 мкг/мл ампициллина и выращивали 18 ч при 37°С на шейкере при перемешивании со скоростью 180 об/мин для получения ночной культуры. Полученные ночные культуры штаммов-продуцентов *E. coli* переносили в среду LB с 100 мкг/мл ампициллина в культуральных колбах Эрленмейера (процент засева составлял 2%) и выращивали при 37°С при перемешивании со скоростью 160 об/мин. При достижении оптической плотности культуры бактерий 0,8 опт. ед. вносили изопропил-β-D1-тиогалактопиранозид до концентрации 0,4 мМ и выращивали при 23°С и 37°С в течение 4 и 24 ч. Оптическую плотность измеряли спектрофотометрически при длине волны 595 нм. Клеточную биомассу получали центрифугированием в течение 20 мин при 4°С и 4000 об/мин на центрифуге «Avanti JXN-30» («Beckman Coulter»).

Выделение Bst_Sso7d, Bst_Sso7d_mut4 и Btlv_Sso7d

Клеточную биомассу (2 г) штаммов-продуцентов *E. coli* BL21 (DE3)pLys/pET16-Bst_Sso7d, BL21 (DE3)pLys/pET16-Bst_Sso7d_mut4 и BL21 (DE3)pLys/pET16-Btlv_Sso7d ресуспендировали в буферном растворе 50 мМ Трис-HCl, 100 мМ NaCl, pH 8,5 с 1 мМ PMSF в соотношении 1 : 10 (w/v) и разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора «Branson sonifier 250» («Branson Ultrasonics») в течение 20 мин при 4°С (цикл —

0,5 с, амплитуда — 50%). Затем центрифугировали при 8000 об/мин в течение 30 мин на центрифуге «Allegra X-30R» («Beckman Coulter»). После центрифугирования супернатант разбавляли в 2 раза буферным раствором 50 мМ Трис-HCl, 100 мМ NaCl pH 8,5 и наносили на хроматографический сорбент IMAC FF, предварительно уравновешенный буферным раствором 50 мМ Трис-HCl, 100 мМ NaCl pH 8,5 (буферный раствор А). Очистку от балластных белков проводили буферным раствором А. Целевой белок элюировали линейным градиентом буферного раствора А с 500 мМ имидазолом.

После металл-хелатной хроматографии фракции, содержащие целевой белок, диализовали против буферного раствора 20 мМ Трис, 100 мМ NaCl, 0,5% Tween-20, 0,1 мМ ЭДТА, pH 8,3. После проведения диализа к раствору белка добавляли глицерин до 50%.

Определение активности ферментов

РНК-зависимую ДНК-полимеразную (ревертазную) активность ферментов определяли с помощью нерадиоактивной методики с флуоресцентной детекцией, основанной на образовании дуплекса полиадениловой РНК и олигонуклеотидного праймера dT18, в который встраивался интеркалирующий краситель GelStar («Lonza»). ДНК-полимеразную активность ферментов определяли с помощью нерадиоактивной методики [27]. В качестве матрицы использовали олигонуклеотид, содержащий на 3'-конце шпилечную структуру. В присутствии ионов Mg^{2+} полимеразы катализировали включение дезоксинуклеотидов, тем самым удлиняя матрицу. Описанные нерадиоактивные методики позволяют определять активности ферментов с помощью амплификаторов с оптическим модулем для детекции флуоресценции в режиме реального времени.

Устойчивость ферментов к температурному воздействию оценивали с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии в диапазоне 55–85°C по 1°C на шаг, продолжительность шага составляла 50 с, кривые плавления детектировались по каналу Fam на приборе «CFX 96» («Bio-Rad Laboratories»).

Оптимальные концентрации ионов в реакционной смеси подбирали аналогично анализу полимеразной активности с использованием концентраций KCl в диапазоне 50–500 мМ.

Аналитические методы

Концентрацию белка определяли с помощью набора «QuDye Protein» (ООО «Люмипроб РУС») на флуориметре «Qubit 4» («Thermo Scientific»), чистоту белка — с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза в денатурирующих условиях [28]. При проведении ДСН-ПААГ-электрофореза в денатурирующих условиях использовали маркер длин белков — маркер молекулярных масс («ThermoScientific»).

Петлевая изотермическая амплификация, совмещённая с обратной транскрипцией

Для оценки потенциальной возможности использования полученных химерных ферментов в составе новых наборов реагентов для диагностики инфекционных заболеваний, проводили тестирование на наборе реагентов «АмплиСенс SARS-CoV-2-IT» (РУ № РЗН 2021/14599). В качестве образцов использовали генетическую конструкцию, представляющую собой бактериофаг MS2 со специфической вставкой гена *ORF1ab* коронавируса. Реакционные смеси содержали 0,8 мкл тестируемых ферментов в концентрации 0,288 ЕД/мкл или такое же количество Bst-полимеразы без Sso7d-домена, а также ревертазу (MMLv). Каждый образец амплифицировали в 3 повторах на приборе «Rotor-Gene Q» («Qiagen»).

Функциональные свойства ферментов также тестировали в лабораторной методике, предназначенной для определения в биологическом материале РНК вируса эпидемического паротита в формате LAMP с совмещённой обратной транскрипцией. Амплифицировали фрагмент гена фосфопротеина вируса эпидемического паротита (размер ампликона 225 пар оснований, GC-состав 54%). В качестве образцов использовали мочу и мазки со слизистой оболочки ротоглотки, содержание РНК вируса эпидемического паротита *(Mumps virus)* подтверждали секвенированием по методу Сэнгера с помощью набора «BigDye Terminator v. 1.1 Cycle Sequencing Kit» («Thermo Fisher Scientific») на секвенаторе «3500xL Genetic Analyzer» («Thermo Fisher Scientific»).

Экстракцию нуклеиновых кислот проводили с помощью экспресс-комплекта «ЭДЭМ» (РУ № 2010/07828), а также лизирующего раствора, содержащего гуанидин гидрохлорид. В качестве контрольного метода экстракции использовали комплект реагентов «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147). Реакционные смеси содержали олигонуклеотиды, комплементарные участкам амплифицируемых мишеней, а также интеркалирующий краситель, что позволило регистрировать накопление специфического продукта амплификации путём измерения интенсивности флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени»; а также смесь глицерина с тиоглицеролом, солями и поверхностно-активными веществами (все использованные дополнительные реагенты разработаны и производятся в ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора). В качестве контрольного лота использовали немутированную форму Bst-полимеразы без Sso7d-домена в концентрации по белку, равной концентрации тестируемых ферментов. Реакцию проводили по программе: 37°C — 5 мин, 65°C — 30 с, 40 циклов с детекцией по каналу FAM (общая продолжительность 25 мин).

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-604

Оценка устойчивости ферментов к ингибиторам LAMP

Для оценки устойчивости ферментов к ингибиторам LAMP использовали муцин («Sigma-Aldrich»), а также предварительно охарактеризованные остаточные образцы биологического материала человека (моча, мазки со слизистой оболочки ротоглотки, плазма и цельная кровь). Мазки со слизистой оболочки ротоглотки содержались в транспортной среде для хранения и транспортировки респираторных мазков (РУ № ФСР 2009/05011; ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

Ингибиторы добавляли в реакционную смесь для LAMP. Реакцию проводили по программе: 37°C — 5 мин, 65°C — 30 с, 40 циклов с детекцией по каналу FAM (общая продолжительность 25 мин). Результаты оценивали по наличию/отсутствию флуоресцентного сигнала (обнаружено/не обнаружено) и величине значений пороговых циклов (Ct), что является достаточным для диагностических систем с качественным определением.

Результаты

Семейство Sso7d включает в себя небольшие многочисленные неспецифические ДНК-связывающие белки, впервые обнаруженные в гипертермофильной бактерии *Archaea sulfolobus*. Они имеют массу 7–10 кДа и обладают различными видами функциональной активности: стабилизация двойной спирали, отжиг ДНК при температуре выше температуры её плавления и предотвращение агрегирования белков. Кроме того, такие белки изменяют конформацию ДНК, вызывая расплетение двойной спирали ДНК [29].

Для получения рекомбинантной Bst-mut4- и Btlv-полимеразы были разработаны уникальные синтетические последовательности с учётом оптимизации частоты встречаемости кодонов для экспрессии в *E. coli*. Далее к генам Bst- и Btlv-полимеразы был присоединён ген *Sso7d,* и такие конструкты были клонированы в экспрессионный вектор pET16b+ для прокариотической экспрессии в клетках *E. coli*. В ходе подбора штаммов-носителей для экспрессии генов *Bst_Sso7d*, *Bst_Sso7d_mut4* и *Btlv_Sso7d* была исследована динамика накопления ферментов при разных температурах (23 и 37°C) и времени индукции белкового биосинтеза (4 и 24 ч). В результате было показано, что все ферменты эффективно нарабатывались в растворимой форме при 23°C в течение 24 ч в клетках *E. coli* BL21 (DE3)pLys (**табл. 2–4**).

Для очистки ферментов от клеточных белков использовали металл-аффинную хроматографию в линейном градиенте имидазола (**рис. 1**).

Фракции с чистотой более 90% объединяли и проводили диализ против буферного раствора 20 мМ Трис, 100 мМ NaCl, 0,5% Твин-20, 0,1 мМ ЭДТА pH 8,3 с последующим концентрированием.

Таблица 2. Подбор штаммов-носителей для экспрессии генов *Bst-Sso7d*

Штамм-носитель *E. coli*	Условия культивирования	Содержание белка, %	Съём клеточной биомассы, г/л
ER2566	23°C, 4 ч	10	2,1
	23°C, 24 ч	15	2,3
	37°C, 4 ч	12	2,3
	37°C, 24 ч	12	2,5
Rosetta De3	23°C, 4 ч	23	2,4
	23°C, 24 ч	23	2,6
	37°C, 4 ч	21	2,5
	37°C, 24 ч	24	2,9
BL21 De3 pLys	23°C, 4 ч	23	2,7
	23°C, 24 ч	**25**	**3,14**
	37°C, 4 ч	24	2,9
	37°C, 24 ч	21	3,2

По данным электрофоретического анализа чистота фермента составила не менее 90% (**рис. 2**) с концентрацией не менее 2 мг/мл.

Стоит отметить, что, несмотря на более высокий процент содержания белка от общей массы влажных клеток: в случае экспрессии Bst_Sso7d — 25% против 23% для Bst_Sso7d_mut4 и Btlv_Sso7d, после очистки более высокие выходы демонстрировали последние два фермента. Это связано с тем, что оптимизация состава кодонов кодирующей последовательности приводит к увеличению выхода белка в растворимой форме.

Тестирование полимеразной активности выделенных ферментов Bst_Sso7d, Bst_Sso7d_mut4 и Btlv_Sso7d проводили на образцах РНК бактериофага MS2 со специфической вставкой, содержащей фрагмент генома SARS-CoV-2, методом LAMP с обратной транскрипцией с использованием реагентов, входящих в состав набора «АмпліСенс SARS-CoV-2-IT». Концентрация матрицы составляла 10^5 копий в реакцию. Все новые ферменты проявляли полимеразную активность, однако средние значения пороговых циклов отличались от контрольного лота Bst-полимеразы без Sso7d-домена в сторону увеличения значений в среднем на 3,73 для Bst_Sso7d, на 3,42 для Bst_Sso7d_mut4 и 2,88 для Btlv_Sso7d (**рис. 3**), что может свидетельствовать о неоптимальных условиях реакции для новых ферментов.

Все исследуемые ферменты показали сопоставимые результаты в экспериментах по оценке их устойчивости к температурному воздействию (**рис. 4**).

Выделенные ферменты Bst_Sso7d, Bst_mut4_Sso7d и фермент сравнения проявляли слабую РНК-зависимую ДНК-полимеразную (ревертаз-

Таблица 3. Подбор штаммов-носителей для экспрессии генов *Bst_Sso7d_mut4*

Штамм-носитель *E. coli*	Условия культивирования	Содержание белка, %	Съём клеточной биомассы, г/л
ER2566	23°C, 4 ч	10	2,1
	23°C, 24 ч	11	2,5
	37°C, 4 ч	14	2,5
	37°C, 24 ч	16	1,7
Rosetta De3	23°C, 4 ч	19	2,2
	23°C, 24 ч	21	2,4
	37°C, 4 ч	21	2,3
	37°C, 24 ч	22	2,5
BL21 De3 pLys	23°C, 4 ч	21	2,1
	23°C, 24 ч	**23**	**2,6**
	37°C, 4 ч	21	2,5
	37°C, 24 ч	20	2,7

Таблица 4. Подбор штаммов-носителей для экспрессии генов Btlv_Sso7d

Штамм-носитель *E. coli*	Условия культивирования	Содержание белка, %	Съём клеточной биомассы, г/л
ER2566	23°C, 4 ч	18	2,0
	23°C, 24 ч	16	2,5
	37°C, 4 ч	16	2,4
	37°C, 24 ч	14	2,8
Rosetta De3	23°C, 4 ч	18	2,3
	23°C, 24 ч	17	2,4
	37°C, 4 ч	19	2,5
	37°C, 24 ч	19	2,7
BL21 De3 pLys	23°C, 4 ч	21	2,4
	23°C, 24 ч	**23**	**2,5**
	37°C, 4 ч	23	2,5
	37°C, 24 ч	21	2,7

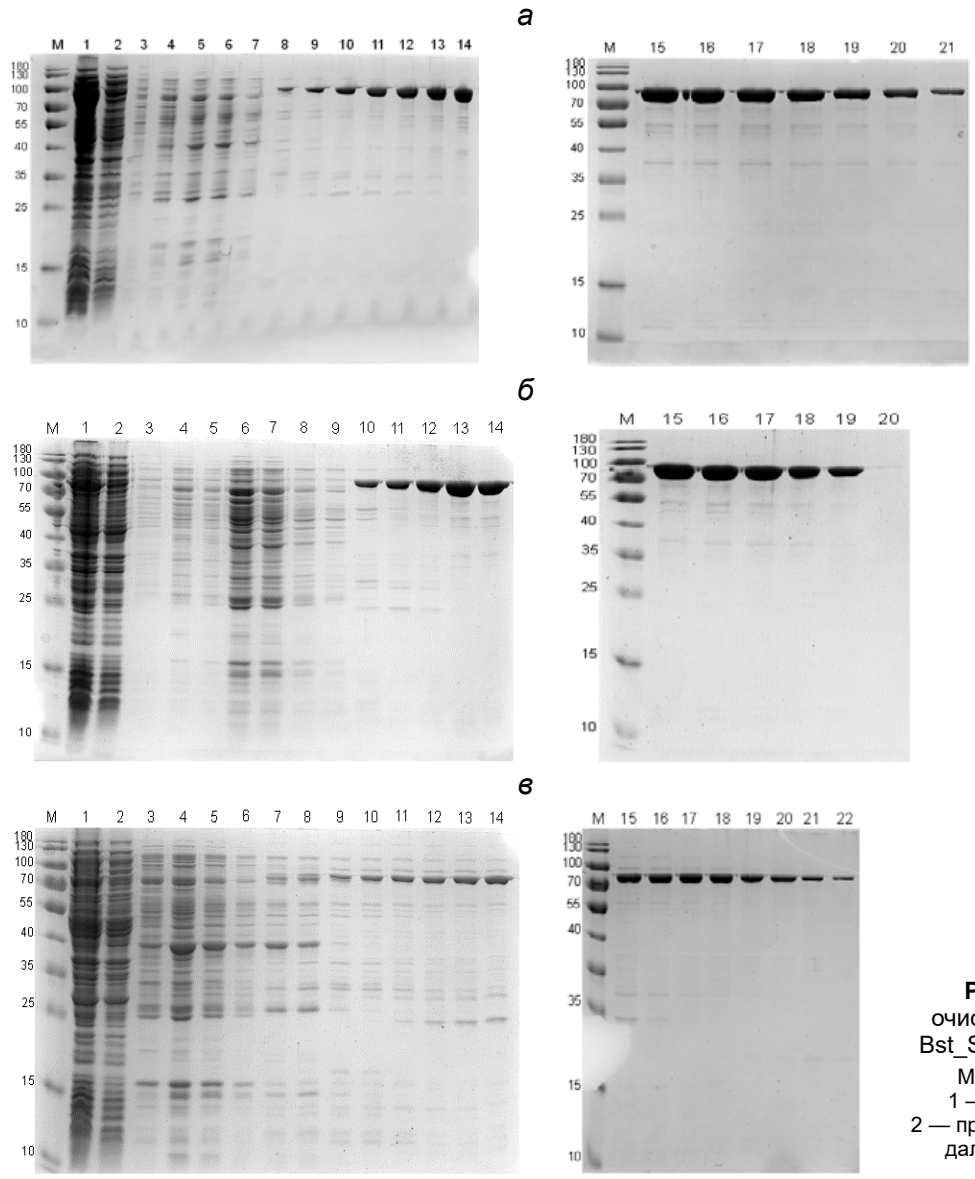


Рис. 1. Электрофореграмма очистки ферментов Bst_Sso7d (*а*), Bst_Sso7d_mut4 (*б*) и Btlv_Sso7d (*в*).
M — маркер молекулярных масс;
1 — осветлённый клеточный лизат;
2 — проскок с металл-хелатного сорбента;
далее — фракции после аффинной хроматографии.

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-604

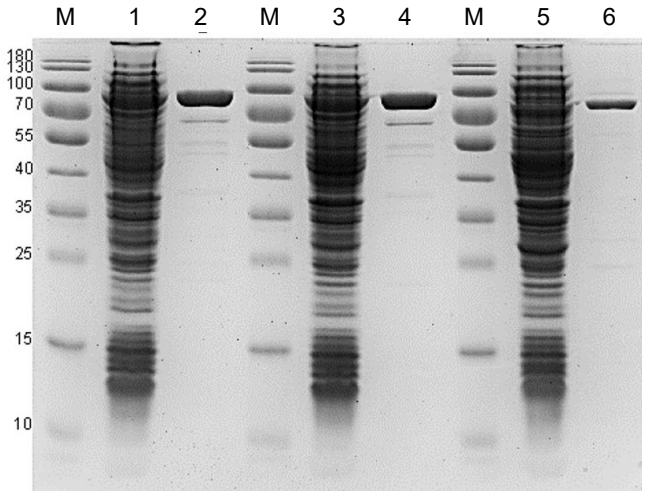


Рис. 2. Электрофореграмма очистки ферментов Bst_Sso7d_mut4, Bst_old_Sso7d и Btlv_Sso7d.

М — маркер молекулярных масс; 1, 3, 5 — осветлённый клеточный лизат Bst_Sso7d_mut4, Bst_Sso7d и Btlv_Sso7d соответственно; 2, 4, 6 — конечный очищенный препарат ферментов Bst_Sso7d_mut4, Bst_Sso7d и Btlv_Sso7d соответственно.

ную) активность как в методике [7], так и при тестировании в наборе «АмплиСенс SARS-CoV-2-IT» без использования фермента ревертазы. Вместе с тем Btlv_Sso7d-полимераза проявляла ревертазную активность, сравнимую с активностью ревертазы (MMLv), но только в присутствии KCl и $(NH_4)_2SO_4$, что позволяет использовать фермент не только для амплификации ДНК/кДНК, но и для обратной транскрипции РНК. Изменение состава реакционной смеси (главным образом, добавление KCl) позволило добиться увеличения полимеразной активности всех химерных ферментов, оптимальная концентрация KCl в буфере для LAMP составила 200 мМ (**рис. 5**).

Наборы реагентов на основе LAMP позволяют сократить время амплификации с 1,5–2,5 ч (метод ПЦР) до 25–40 мин, при этом имеют высокую специфичность за счёт использования 4–6 олигонуклеотидов. Однако процесс экстракции нуклеиновых кислот из биологического материала по-прежнему является достаточно длительным. Исследуемые образцы обрабатываются лизирующим раствором, вследствие чего происходит разрушение клеточных стенок бактерий и вирусных оболочек с последующим высвобождением в раствор компонентов клетки и нуклеиновых кислот. Применение в протоколе экстракции последующих отмывок приводит к удалению из раствора веществ и компонентов клетки, которые ингибируют ПЦР. Экспресс-методы отличаются отсутствием этапа отмывки либо наличием всего одной отмывки: клинический материал, взятый в специальную транспортную среду (например, «ТС-ЭДЭМ»), подвергается термической обработке и центрифугированию, в результате чего нерастворимые компоненты осаждаются, а нуклеиновые кислоты, остающиеся в надосадочной жидкости, используются для проведения ПЦР. Однако после обеззараживания без экстракции или после экспресс-экстракции образцы РНК/ДНК содержат примеси, которые могут служить ингибиторами ПЦР, например, компоненты транспортных сред, лизирующего раствора, крови, мазков, мочи и других биоматериалов.

Функциональные свойства полученных в работе полимераз были проверены на устойчивость к наиболее часто встречающимся ингибиторам (компонентам цельной крови, плазмы крови, мочи, муцину) в реакции LAMP в модельной системе с использованием положительных контрольных образцов. Ингибиторы добавляли в реакционную смесь, содержащую праймеры из набора реагентов «АмплиСенс SARS-CoV-2-IT» и выделенную РНК бактериофага MS2 со специфической вставкой, содержащей фрагмент генома SARS-CoV-2. Результаты оценивали по наличию/отсутствию флуоресцентного сигнала («обнаружено»/«не обнаружено»), что

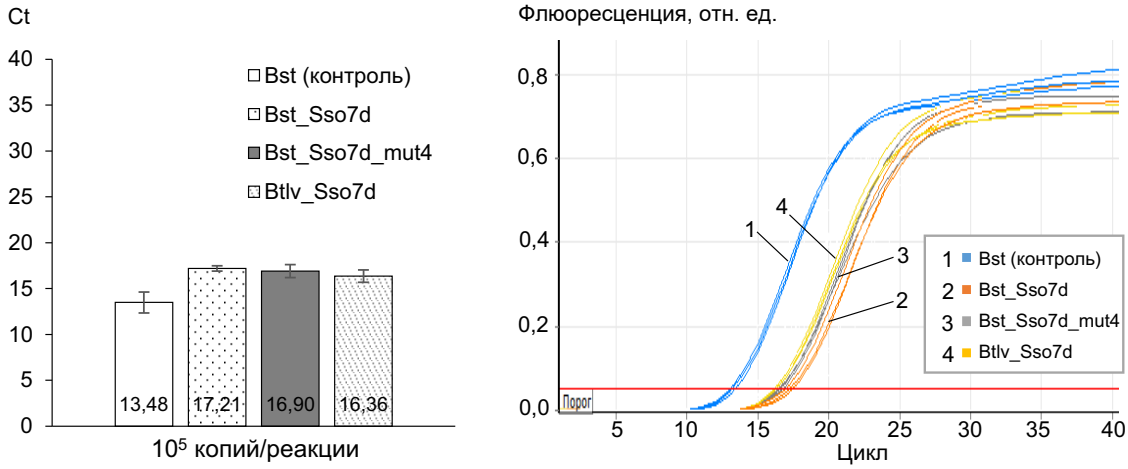


Рис. 3. Оценка активности полученных полимераз в наборе реагентов «АмплиСенс SARS-CoV-2-IT» (средние значения порогового цикла).

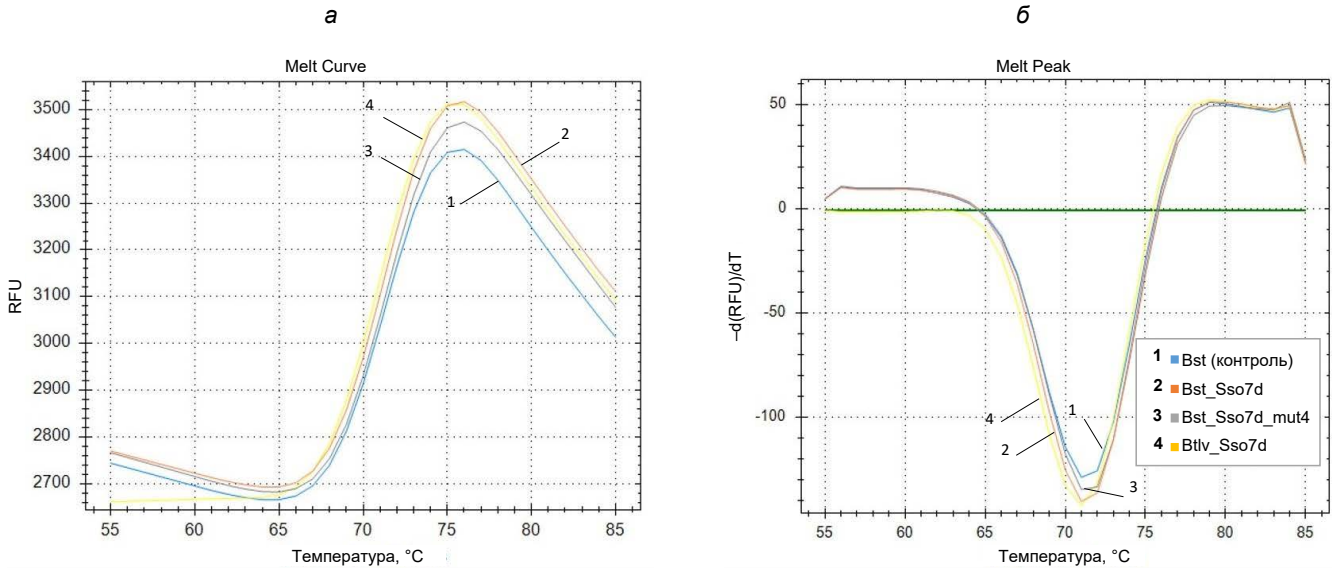


Рис. 4. Термостабильность химерных полимераз.
а — профили термической денатурации; *б* — производные величины флуоресценции от температуры.

является достаточным для диагностических систем с качественным определением (**табл. 5**).

Модифицированные ферменты на основе Bst-полимеразы, содержащие ДНК-связывающий домен Sso7D: Bst_Sso7d и Bst_Sso7d_mut4, продемонстрировали сниженную устойчивость к присутствию в реакционной смеси цельной крови и мочи по сравнению с контрольным ферментом. В то же время фермент Btlv_Sso7d характеризуется более высокой устойчивостью к присутствию цельной крови (10 об. %), плазмы (1 об. %), мочи (10 об. %). Все ферменты сохраняют свою активность в присутствии муцина до 0,5 мг/мл.

Дальнейшие эксперименты по определению влияния ингибиторов на эффективность реакции LAMP проводились только с использованием фермента Btlv_Sso7d. Устойчивость полимеразы Btlv_Sso7d к ингибиторам из биоматериала (слизь из ротоглоточных мазков, соли из мочи), компонентам транспортной среды (транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков (РУ № ФСР 2009/05011)) и лизирующего раствора (1М гуанидина гидрохлорида) была также протестирована на 12 клинических образцах мочи и 12 образцах мазков со слизистой оболочки ротоглотки, содержащих РНК вируса эпидемического паротита в концентрации 10^5–10^8 копий/мл, выделенных тремя различными методами: методом, основанным на преципитации с использованием набора «РИБО-преп»; экспресс-методом «ЭДЭМ»; обработкой раствором 1М гуанидина гидрохлорида (для обеззараживания биоматериала) без последующих отмывок. Далее все выделенные образцы сравнивали в методике LAMP без добавления ревертазы (MMLv) (**рис. 6**).

При использовании Btlv_Sso7d-полимеразы, в отличие от контрольного фермента, реакция LAMP сохраняет свою эффективность во всех изученных условиях, а все биологические образцы, содержащие РНК вируса эпидемического паротита использованные в работе, идентифицируются как положительные. Наблюдается также не такое значительное повышение значений Ct при анализе образцов после выделения нуклеиновых кислот экспресс-методом «ЭДЭМ», как в случае контрольного фермента. Всё это показывает, что полимераза Btlv_Sso7d обладает достаточной ревертазной активностью и повышенной толерантностью к ингибиторам для качественного обнаружения РНК вируса эпидемического паротита (рис. 6).

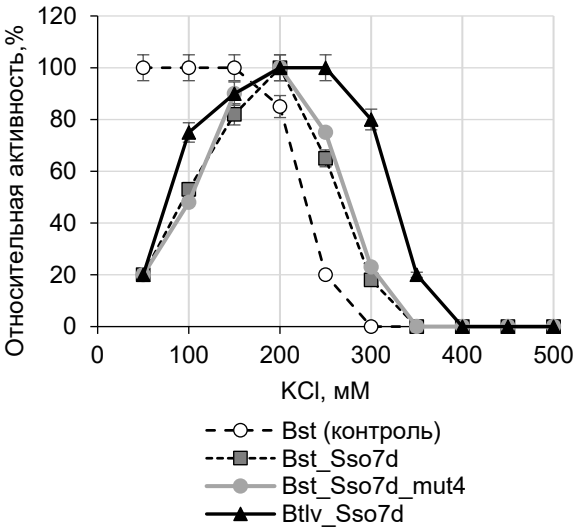


Рис. 5. Оптимальная концентрация KCl для химерных полимераз.

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-604

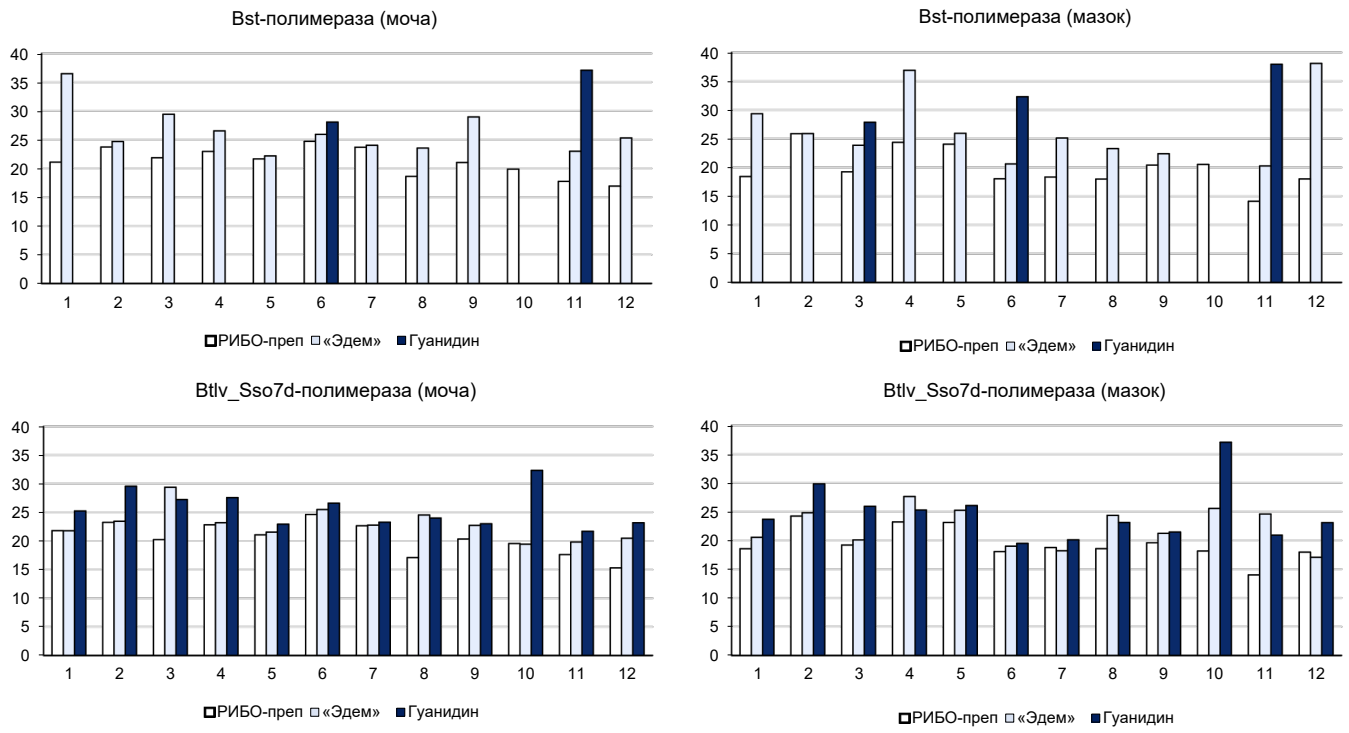


Рис. 6. Выявление вируса эпидемического паротита в биологических образцах с помощью LAMP с использованием различных полимераз без добавления ревертазы.

За счёт более высокой толерантности к ингибиторам применение новой Btlv_Sso7d-полимеразы в реакциях изотермической амплификации на основе метода LAMP в сочетании с экспресс-методами экстракции нуклеиновых кислот, которые включают только этап лизиса, позволит вывести молекулярную диагностику на новый уровень скорости и сделать возможным применение тестов на основе LAMP в полевых условиях или «у постели больного».

Обсуждение

Метод LAMP является перспективным направлением в молекулярной диагностике инфекционных заболеваний. Основное достоинство метода — это более короткое время анализа: этап амплификации занимает всего 25–40 мин, а чувствительность и специфичность метода при этом сопоставимы с методом ПЦР [1, 2]. Изотермический режим проведения реакции позволяет использовать более простое оборудование для проведения реакции: термостат с модулем детекции флуоресценции вместо амплификатора.

Кроме этапа собственно амплификации, любой анализ чаще всего включает этап выделения нуклеиновых кислот. Выделение нуклеиновых кислот проводится с целью избавления от основных ингибиторов амплификации, которые могут присутствовать в биологических образцах. В среднем, в зависимости от используемого метода, этап выделения может занимать от 1 до 3 ч. Сокращение этой стадии за счёт применения экспресс-методов выделения нуклеиновых кислот (10–30 мин) позволит существенно снизить общее время исследования. Для успешной реализации такой стратегии необходимы разработка и применение ферментов, устойчивых к основным ингибиторам амплификации.

Полученные в работе Bst-полимеразы, содержащие ДНК-связывающий домен Sso7D: Bst_Sso7d и Bst_Sso7d_mut4 продемонстрировали сниженную устойчивость к присутствию в реакционной смеси цельной крови и мочи по сравнению с контрольным ферментом, не содержащим дополнительных доменов. В то же время фермент Btlv_Sso7d характеризуется более высокой устойчивостью к присутствию цельной крови (10 об. %), плазмы (1 об. %), мочи (10 об. %). Все ферменты сохраняют свою активность в присутствии муцина до 0,5 мг/мл. Эти данные демонстрируют, что добавление ДНК-связывающего домена не привело к повышению устойчивости к ингибирующему эффекту мочи и цельной крови в случае Bst-полимеразы. В литературе опубликованы подобные работы, свидетельствующие об обратном эффекте при использовании различных Bst-подобных полимераз [17, 18, 30, 31]. Однако родственный химерный фермент Btlv_Sso7d, полученный в данной работе, демонстрирует высокую устойчивость к ингибирующему эффекту компонентов цельной крови, плазмы и мочи на реакцию LAMP. Такая разница результатов может объясняться особенностями генно-инженерных конструкций, наличием или отсутствием дополнительных спейсеров между ДНК-связывающим до-

Таблица 5. Сравнение влияния ингибиторов на обнаружение РНК вируса эпидемического паротита при использовании тестируемых ферментов

Ингибиторы		Обнаружение РНК вируса эпидемического паротита			
название	концентрация	Bst-полимераза (контроль)	Bst_Sso7d	Bst_Sso7d_mut4	Btlv_Sso7d
Цельная кровь, об. %	0	+	+	+	+
	0,5	+	+	+	+
	1,0	+	+	+	+
	2,5	+	–	–	+
	5,0	+	–	–	+
	10,0	–	–	–	+
Плазма крови, об. %	0	+	+	+	+
	1	–	–	–	+
Муцин, мг/мл	0	+	+	+	+
	0,2	+	+	+	+
	0,5	+	+	+	+
Моча, об. %	0	+	+	+	+
	5	+	–	–	+
	10	–	–	–	+

меном и полимеразой, структурой этих спейсеров, условиями культивирования и очистки рекомбинантных белков. Полученные данные демонстрируют необходимость дальнейших детальных исследований в данной области для определения влияния ДНК-связывающих доменов на свойства химерных ферментов в каждом конкретном случае и определения взаимосвязей между структурой и функциями химерных ферментов.

Заключение

В бактериальной системе экспрессии на основе клеток *E. coli* получены рекомбинантные химерные ферменты с вытесняющей активностью: Bst_Sso7d, Bst_Sso7d_mut4 и Btlv_Sso7d. Разработанные протоколы получения и очистки позволяют получать ферменты в растворимой форме с выходом до 25% от всей собранной клеточной массы. В реакциях LAMP химерные полимеразы продемонстрировали сходную активность с Bst-полимеразой без Sso7d-домена. Вместе с тем Btlv_Sso7d-полимераза характеризуется повышенной ревертазной активностью и устойчивостью к ингибиторам, что позволяет использовать её в наборах реагентов для диагностики инфекционных заболеваний методом LAMP в сочетании с экспресс-экстракцией нуклеиновых кислот путём термоинактивации или лизиса в присутствии гуанидина хлорида без последующих отмывок от компонентов биоматериала и лизирующего раствора. Это позволяет существенно сократить время проведения анализа.

По мере роста потребности в быстрой и точной диагностике инфекционных заболеваний использование методов LAMP, а следовательно, и аналогов Bst-полимеразы с улучшенными свойствами, будет только увеличиваться.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ|REFERENCES

1. Рубель М.С., Дубровина И.А., Мясников В.А. и др. Сравнительная характеристика современных экспресс-методов диагностики инфекционных заболеваний, основанных на методе изотермической полимеразной цепной реакции. *Вестник Российской Военно-медицинской академии*. 2018;(1):160–3. Rubel M.S., Dubrovina I.A., Miasnikov V.A., et al. Comparative characteristics of modern express methods of diagnosing infectious diseases base on isothermal PCR technology. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2018;(1):160–3. EDN: https://elibrary.ru/emrzyi
2. Чемисова О.С., Цырулина О.А., Трухачев А.Л., Носков А.К. Сравнительный анализ методов изотермической амплификации нуклеиновых кислот. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2022;99(1):126–38. Chemisova O.S., Tsyrulina O.A., Trukhachev A.L., Noskov A.K. Comparative analysis of methods for isothermal amplification of nucleic acids. *Journal Of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2022;99(1):126–38. DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-176 EDN: https://elibrary.ru/qbqrwj
3. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(12):E63. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63
4. Смирнова Д.И., Петруша О.А., Грачёва А.В. и др. Быстрая диагностика генитального герпеса методом петлевой изотермической амплификации ДНК с флуоресцентной детекцией. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019;96(6):40–6. Smirnova D.I., Petrusha O.A., Gracheva A.V., et al. Rapid diagnostics of genital herpes by loop-mediated isothermal amplification method with fluorescent detection. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2019;96(6):40–6. DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-40-46 EDN: https://elibrary.ru/yskkec
5. Акимкин В.Г., Петров В.В., Красовитов К.В. и др. Молекулярные методы диагностики новой коронавирусной инфекции: сравнение петлевой изотермической амплификации и

полимеразной цепной реакции. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(6):417–24. Akimkin V.G., Petrov V.V., Krasovitov K.V., et al. Molecular methods for diagnosing novel coronavirus infection: comparison of loop-mediated isothermal amplification and polymerase chain reaction. *Problems of Virology.* 2022;66(6): 417–24. DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-86
EDN: https://elibrary.ru/bsgdlo

6. Shirshikov F.V., Bespyatykh J.A. Loop-mediated isothermal amplification: from theory to practice. *Russ. J. Bioorg. Chem*. 2022;48(6):1159–74.
DOI: https://doi.org/10.1134/S106816202206022X
7. Пика М.И., Михеева О.О., Соловьева Е.Д. и др. Получение Bst-полимеразы для диагностики различных инфекций методом петлевой изотермической амплификации. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(3):210–8. Pika M.I., Mikheeva O.O., Solovyova E.D., et al. Production of Bst polymerase for diagnosis of different infections using loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2023;100(3):210–8.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-364
EDN: https://elibrary.ru/phcmoq
8. Wada K., Suzuki H. Biotechnological platforms of the moderate thermophiles, *Geobacillus* species: notable properties and genetic tools. In: Salwan R., Sharma V., eds. *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles.* Academic Press; 2020:195–218.
DOI: https://doi.org/10.1016/C2018-0-03860-8
9. Stenesh J., McGowan G.R. DNA polymerase from mesophilic and thermophilic bacteria. III. Lack of fidelity in the replication of synthetic polydeoxyribonucleotides by DNA polymerase from *Bacillus licheniformis* and *Bacillus stearothermophilus. Biochim. Biophys. Acta*. 1977;475(1):32–41.
DOI: https://doi.org/10.1016/0005-2787(77)90336-7
10. Chien A., Edgar D.B., Trela J.M. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol*. 1976;127(3):1550–7.
DOI: https://doi.org/10.1128/jb.127.3.1550-1557.1976
11. Oscorbin I., Filipenko M. Bst polymerase – a humble relative of Taq polymerase. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2023;21:4519–35.
DOI: https://doi.org/10.1016/j.csbj.2023.09.008
12. Li P., Amenov A., Kalendar R., et al. Cloning and purification of large fragment of DNA polymerase I from geobacillus stearothermophilus and application in isothermal DNA amplification. *Eurasian J. Appl. Biotechnol.* 2017;(1):50–8.
EDN: https://elibrary.ru/zbenmt
13. Oscorbin I.P., Boyarskikh U.A., Filipenko M.L. Large fragment of DNA polymerase I from Geobacillus sp. 777: cloning and comparison with DNA polymerases I in practical applications. *Mol. Biotechnol*. 2015;57(10):947–59.
DOI: https://doi.org/10.1007/s12033-015-9886-x
14. Chander Y., Koelbl J., Puckett J., et al. A novel thermostable polymerase for RNA and DNA loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Front. Microbiol*. 2014;5:395.
DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00395
15. Wang Y., Prosen D.E., Mei L., et al. A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance in vitro. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(3):1197–207.
DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gkh271
16. Sidstedt M., Rådström P., Hedman J. PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS-mechanisms and solutions. *Anal. Bioanal. Chem*. 2020;412(9):2009–23.
DOI: https://doi.org/10.1007/s00216-020-02490-2
17. Oscorbin I.P., Belousova E.A., Boyarskikh U.A., et al. Derivatives of Bst-like Gss-polymerase with improved processivity and inhibitor tolerance. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(16):9595–610.
DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gkx645
18. Li J., Li Y., Li Y., et al. An enhanced activity and thermostability of chimeric Bst DNA polymerase for isothermal amplification applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2023;107(21):6527–40. DOI: https://doi.org/10.1007/s00253-023-12751-6
19. Yu Z., Wang J. Strategies and procedures to generate chimeric DNA polymerases for improved applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2024;108(1):445.
DOI: https://doi.org/10.1007/s00253-024-13276-2
20. Paik I., Bhadra S., Ellington A.D. Charge engineering improves the performance of Bst DNA polymerase fusions. *ACS Synth. Biol*. 2022;11(4):1488–96.
DOI: https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00559
21. Ordóñez C.D., Lechuga A., Salas M., Redrejo-Rodríguez M. Engineered viral DNA polymerase with enhanced DNA amplification capacity: a proof-of-concept of isothermal amplification of damaged DNA. *Sci. Rep*. 2020;10(1):15046.
DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-020-71773-6
22. Coulther T.A., Stern H.R., Beuning P.J. Engineering polymerases for new functions. *Trends Biotechnol*. 2019;37(10):1091–103.
DOI: https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.03.011
23. Lischer K., Tansil K.P., Ginting M.J., et al. Cloning of DNA Polymerase I *Geobacillus thermoleovorans* SGAir0734 from a Batu Kuwung Hot Spring in *Escherichia coli. Int. J. Technol.* 2020;11(5):921–30.
DOI: https://doi.org/10.14716/ijtech.v11i5.4311
24. Gaultier N.E., Junqueira A.C.M., Uchida A., et al. Genome sequence of *Geobacillus thermoleovorans* SGAir0734, isolated from Singapore air. *Genome Announc*. 2018;6(27):e00636–18.
DOI: https://doi.org/10.1128/genomea.00636-18
25. Xiong A.S., Yao Q.H., Peng R.H., et al. A simple, rapid, high-fidelity and cost-effective PCR-based two-step DNA synthesis method for long gene sequences. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(12):e98. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gnh094
26. Черкашина А.С., Михеева О.О., Пика М.И. и др. Способ получения большого фрагмента Bst-полимеразы (варианты). Патент РФ № 2 809 366;2023. Cherkashina A.S., Mikheeva O.O., Pika M.I., et al. Method for obtaining a large fragment of Bst polymerase (variants). Patent RF № 2 809 366;2023.
27. Брагин А.Г., Глушков С.А., Иванов М.К. и др. Определение ДНК-полимеразной и нуклеазной активностей ДНК-зависимых полимераз с использованием флуоресцентной детекции в режиме реального времени. *Биохимия*. 2008;73(9)1252–64. EDN: https://elibrary.ru/jubdgz Bragin A.G., Glushkov S.A., Ivanov M.K., et al. Determination of DNA polymerase and nuclease activities of DNA-dependent polymerases using real-time fluorescent detection. *Biochemistry.* 2008;73(9):1007–17.
DOI: https://doi.org/10.1134/S0006297908090083
EDN: https://elibrary.ru/lliwvl
28. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259):680–5. DOI: https://doi.org/10.1038/227680a0
29. Napoli A., Zivanovic Y., Bocs C., et al. DNA bending, compaction and negative supercoiling by the architectural protein Sso7d of Sulfolobus solfataricus. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(12):2656–62. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gkf377
30. Xiang R., Liu G.Y., Hou Y., et al. Double domain fusion improves the reverse transcriptase activity and inhibitor tolerance of Bst DNA polymerase. *Int. J. Biol. Macromol*. 2024;274(Pt. 1):133243.
DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.133243
31. Hernández-Rollán C., Ehrmann A.K., Vlassis A., et al. Neq2X7: a multi-purpose and open-source fusion DNA polymerase for advanced DNA engineering and diagnostics PCR. *BMC Biotechnol*. 2024;24(1):17.
DOI: https://doi.org/10.1186/s12896-024-00844-7

Информация об авторах

Замотаева Татьяна Львовна✉ — н. с., Центр разработки, развития продукции и инноваций ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, sazonova@pcr.ms, https://orcid.org/0009-0003-9799-3749

Дедяева Екатерина Александровна — старший технолог-разработчик, Центр разработки, развития продукции и инноваций, ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, safronova.e@cmd.su, https://orcid.org/0000-0002-2501-0956

Михеева Ольга Олеговна — н. с. научной группы генной инженерии и биотехнологии отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, olga.mikheeva.92@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-1721-5134

Пика Мария Игоревна — м. н. с., научной группы генной инженерии и биотехнологии отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, m.zotova@cmd.su, https://orcid.org/0000-0002-3279-6811

Черкашин Евгений Александрович — канд. хим. наук, рук. Центра разработки, развития продукции и инноваций ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, e.cherkashin@pcr.ms, https://orcid.org/0000-0002-3627-6047

Черкашина Анна Сергеевна — канд. хим. наук, рук. научной группы генной инженерии и биотехнологии отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, cherkashina@pcr.ms, https://orcid.org/0000-0001-7970-7495

Акимкин Василий Геннадьевич — д-р мед. наук, проф., академик РАН, директор ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, v.akimkin@cmd.su, https://orcid.org/0000-0003-4228-9044

Участие авторов: *Замотаева Т.Л.* — концепция и дизайн исследования, проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; *Дедяева Е.А., Пика М.И.* — проведение экспериментов; *Михеева О.О.* — проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; *Черкашин Е.А., Черкашина А.С.* — концепция и дизайн исследования, подготовка текста; *Акимкин В.Г.* — одобрение окончательного варианта статьи для публикации. Все авторы одобрили финальную версию статьи для публикации.

Статья поступила в редакцию 30.04.2025;
принята к публикации 16.06.2025;
опубликована online 10.08.2025;
опубликована 28.09.2025

Information about the authors

Tatyana L. Zamotaeva✉ — researcher, Center for development, product development and innovation, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, sazonova@pcr.ms, https://orcid.org/0009-0003-9799-3749

Ekaterina A. Dedyaeva — technologist-developer, Center for development, product development and innovation, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, safronova.e@cmd.su, https://orcid.org/0000-0002-2501-0956

Olga O. Mikheeva — researcher, Research group of genetic engineering and biotechnology, Department of molecular diagnostics and epidemiology, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, olga.mikheeva.92@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-1721-5134

Maria I. Pika — junior researcher, Research group of genetic engineering and biotechnology, Department of molecular diagnostics and epidemiology, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, m.zotova@cmd.su, https://orcid.org/0000-0002-3279-6811

Evgeny A. Cherkashin — Cand. Sci. (Chem.), Head, Center for development, product development and innovation, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, e.cherkashin@pcr.ms, https://orcid.org/0000-0002-3627-6047

Anna S. Cherkashina — Cand. Sci. (Chem.), Head, Research group of genetic engineering and biotechnology, Department of molecular diagnostics and epidemiology, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, cherkashina@pcr.ms, https://orcid.org/0000-0001-7970-7495

Vasily G. Akimkin — Dr. Sci. (Med.), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Director, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, v.akimkin@cmd.su, https://orcid.org/0000-0003-4228-9044

Author contribution: *Zamotaeva T.L.* — the study concept and design, conducting of the experiments, collecting, analyzing and interpreting of the data, preparing of the text; *Dedyaeva E.A.*, *Pika M.I.* — conducting of the experiments; *Mikheeva O.O.* — conducting experiments, collecting, analyzing and interpreting of the data, preparing of the text; *Cherkashin E.A., Cherkashina A.S.* — the study concept and design, preparing of the text; *Akimkin V.G.* — final approval of the article for publication. All authors made a final approval of the version to be published.

The article was submitted 30.04.2025;
accepted for publication 16.06.2025;
published online 10.08.2025;
published 28.09.2025

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-679
ORIGINAL RESEARCHES

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оригинальное исследование
https://doi.org/10.36233/0372-9311-679

Характеристика возбудителей сальмонеллёзов, циркулирующих в Приморском крае до и во время пандемии COVID-19

Показеева Ю.Н.[1,2]✉, Семейкина Л.М.[3], Яковлев А.А.[1,2], Тимченко Н.Ф.[1], Макаренкова И.Д.[1], Щелканов М.Ю.[1,4]

[1]Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, Владивосток, Россия;
[2]Тихоокеанский медицинский университет, Владивосток, Россия;
[3]Центр гигиены и эпидемиологии в Приморском крае, Владивосток, Россия;
[4]Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

Аннотация

Введение. Сальмонеллёзы, для которых характерны острые вспышки заболеваемости, являются актуальной проблемой для здравоохранения.

Цель исследования: оценить влияние пандемии COVID-19 на эпидемиологические закономерности и молекулярно-биологические характеристики сальмонеллёзных инфекций в Приморском крае за 2019–2023 гг.

Материалы и методы. Проведён ретроспективный эпидемиологический анализ заболеваемости населения Приморского края сальмонеллёзами в период пандемии COVID-19. Методами щелочного лизиса и серологического типирования установлены плазмидная характеристика штаммов нетифоидных *Salmonella* и их серотип.

Результаты. Во время пандемии COVID-19 как в России, так и в Приморском крае регистрация сальмонеллёзов была значительно ниже, чем в допандемический период, а сезонность сальмонеллёзов сдвинулась на осенние месяцы. Выявлена обратная связь средней силы между данными помесячной заболеваемости сальмонеллёзами и COVID-19. Особых изменений в плазмидном спектре и в доле регистрации по серогруппам и серотипам *Salmonella* не наблюдалось. Показано, что сальмонеллёзные инфекции в Приморском крае в основном вызваны штаммами *S. enteritidis* с плазмидной характеристикой 38 МДа, 38:1,4 МДа, 38:2,3 МДа, 38:4,4 МДа, выявлялись также редкие варианты плазмидных типов. Влияние пандемии COVID-19 на появление новых плазмидных типов не установлено.

Заключение. Представленные результаты исследования об эпидемиологической и молекулярно-биологической характеристике *Salmonella*, циркулирующей в Приморском крае в период пандемии COVID-19, открывают перспективы для понимания эколого-эпидемиологических закономерностей развития эпидемического процесса сальмонеллёзов.

Ключевые слова: *сальмонеллёз, Salmonella, серогруппа, серотип, плазмидный тип, пандемия COVID-19, вирус SARS-CoV-2*

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом НИИЭМ им. Г.П. Сомова (протокол № 3 от 03.02.2022).

Источник финансирования. Исследование выполнено по Государственному заданию по теме «Мониторинг сальмонеллезной инфекции на Дальнем Востоке» (№ 123030600019-1).

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Показеева Ю.Н., Семейкина Л.М., Яковлев А.А., Тимченко Н.Ф., Макаренкова И.Д., Щелканов М.Ю. Характеристика возбудителей сальмонеллёзов, циркулирующих в Приморском крае до и во время пандемии COVID-19. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2025;102(4):404–412.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-679
EDN: https://www.elibrary.ru/UUUAQF

© Показеева Ю.Н., Семейкина Л.М., Яковлев А.А., Тимченко Н.Ф., Макаренкова И.Д., Щелканов М.Ю., 2025

Original Study Article
https://doi.org/10.36233/0372-9311-679

Characteristics of salmonellosis pathogens circulating in Primorsky Krai before and during the COVID-19 pandemic

Yulia N. Pokazeeva[1,2]✉, Lyubov M. Semeykina[3], Anatoly A. Yakovlev[1,2], Nelli F. Timchenko[1], Ilona D. Makarenkova[1], Mikhail Yu. Shchelkanov[1,4]

[1]Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia;
[2]Pacific Medical University, Vladivostok, Russia;
[3]Center for Hygiene and Epidemiology in Primorsky territory, Vladivostok, Russia;
[4]Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

Abstract

Introduction. To date, among intestinal infections, salmonellosis is a pressing health problem worldwide, including in the Russian Federation, causing acute infectious outbreaks of disease.

Objective of the study: to assess the impact of the COVID-19 pandemic on the epidemiological patterns and molecular biological characteristics of salmonella infection in Primorsky Krai for 2019–2023.

Materials and methods. A retrospective epidemiological analysis of salmonellosis incidence during the COVID-19 pandemic in the population of Primorsky Krai was conducted. Plasmid characteristics of non-typhoidal *Salmonella* strains and their serotype were established using alkaline lysis and serological typing methods.

Results. During the COVID-19 pandemic, both in the Russian Federation and in Primorsky Krai, the registration of salmonellosis was significantly lower than in the pre-pandemic period, and the seasonality of salmonellosis shifted to the autumn months. An inverse relationship of medium strength was revealed between the monthly incidence of salmonellosis and COVID-19. No significant changes in the plasmid spectrum and in the proportion of registration by serogroups and serotypes of *Salmonella* were observed. It was shown that salmonellosis infection in Primorsky Krai is mainly caused by *S. enteritidis* strains with a plasmid characteristic of 38 MDa, 38:1.4 MDa, 38:2.3 MDa, 38:4.4 MDa, rare variants of plasmid types were also detected, the influence of the COVID-19 pandemic on the emergence of new plasmid types has not been established.

Conclusion. The presented results of the study on the molecular biological characteristics of *Salmonella* circulating in Primorsky Krai during the COVID-19 pandemic will open up prospects for understanding the ecological and epidemiological patterns of the development of the epidemic process of salmonella infection.

Keywords: *salmonellosis, Salmonella, serogroup, serotype, plasmid type, COVID-19 pandemic, SARS-CoV-2 virus*

Ethical approval. The study was conducted with the informed consent of patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rospotrebnadzor (protocol No. 3 February 03.2022).

Funding source. The study was carried out under the State Assignment on the topic "Monitoring for Salmonella Infection in the Far East" (No. 123030600019-1)

Conflict of interest. The authors confirm the absence of a conflict of interest related to the publication of this article.

For citation: Pokazeeva Yu.N., Semeykina L.M., Yakovlev A.A., Timchenko N.F., Makarenkova I.D., Shchelkanov M.Yu. Characteristics of salmonellosis pathogens circulating in Primorsky Krai before and during the COVID-19 pandemic *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2025;102(4):404–412.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-679
EDN: https://www.elibrary.ru/UUUAQF

Введение

Сальмонеллёзы вызываются различными серотипами бактерий рода *Salmonella*, относятся к полиэтиологическим инфекционным заболеваниям у людей и животных и являются огромной проблемой для общественного здравоохранения во всём мире, способствуя увеличению экономического бремени. В зависимости от состояния здоровья организма хозяина и серотипа *Salmonella*, устойчивости бактерий к противомикробным препаратам, на 11–20 млн случаев сальмонеллёза в мире ежегодно регистрируется до 161 000 смертельных исходов [1].

В современный период сальмонеллёзы являются одной из наиболее распространённых бактериальных кишечных инфекций с тенденцией к увеличению вспышек заболеваемости. По данным официальной статистики, в последние годы в России средний показатель заболеваемости в 2021 г. находился на уровне 13,61 на 100 тыс. населения[1], в 2022 г. — 17,1, в 2023 г. — 21,45, при этом в ряде

[1] О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2023 году: Государственный доклад. М.; 2024. 368 с.

© Pokazeeva Yu.N., Semeykina L.M., Yakovlev A.A., Timchenko N.F., Makarenkova I.D., Shchelkanov M.Yu., 2025

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-679

территориальных округов он превышает средний показатель по стране.

В Приморском крае на протяжении последнего десятилетия на фоне существенного изменения этиологической структуры инфекций кишечной группы в сторону увеличения доли ротавирусной и норовирусной инфекций и снижения удельного веса таких заболеваний, как вирусные гепатиты А и Е и шигеллёзы, удельный вес сальмонеллёзов практически не изменился и колеблется в пределах 10% [2].

В 2020 г. возникла чрезвычайная ситуация в связи с развитием пандемии новой коронавирусной инфекции (COVID-19), вызванной вирусом SARS-CoV-2, что существенно повлияло на заболеваемость другими инфекционными заболеваниями с различными механизмами передачи [3–9]. В литературе в основном представлены исследования, показывающие влияние COVID-19 на острые респираторные вирусные инфекции. Встречаются лишь отдельные публикации, в которых рассматривается влияние пандемии COVID-19 на эпидемиологические закономерности и микробиологические характеристики инфекций, относящихся к кишечной группе [4], при этом практически отсутствуют данные о его влиянии на эпидемиологические закономерности развития сальмонеллёзов в России.

Цель исследования — оценить влияние пандемии COVID-19 на эпидемиологические закономерности и молекулярно-биологические характеристики нетифоидных сальмонеллёзов в Приморском крае за 2019–2023 гг.

Материалы и методы

Ретроспективный эпидемиологический анализ заболеваемости сальмонеллёзами и COVID-19 населения Приморского края проводили на основе данных федерального государственного статистического наблюдения по Приморскому краю — «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» (форма № 2) за 2009–2023 гг.

Спектр плазмидных типов в штаммах сальмонелл определяли методом щелочного лизиса [10]. Известные плазмидные типы RP4 (38 МДа), pBR322 (2,9 МДа), pVM82 (82 МДа) использовали как стандарты молекулярной массы.

При выполнении метода серологического типирования использовали диагностические сальмонеллёзные адсорбированные сухие сыворотки для реакции агглютинации («Петсал») в соответствии с антигенной схемой Кауфмана–Уайта [11].

Статистическую обработку данных проводили с использованием программ «Microsoft Excel 2010» и «Statistica v. 10». Величину критического уровня значимости *p* при проверке статистических гипотез принимали равной 0,05.

Результаты

Период с 2009 по 2012 г. в Приморском крае характеризовался ростом заболеваемости сальмонеллёзами, максимум был зарегистрирован в 2012 г. и составил 71,8 на 100 тыс. населения. В последующие годы наметилась тенденция к снижению заболеваемости, и к 2022 г. её уровень снизился до 13,3 на 100 тыс. населения (темп прироста составил –4,2), тогда как в России заболеваемость сальмонеллёзами была более стабильной (темп прироста составил –3,4). При этом показатели заболеваемости в Приморском крае превышали данные по стране в 2009–2019 гг., а начиная с 2020 г. практически сравнялись (**рис. 1**). В 2023 г. отмечен рост заболеваемости как в Приморском крае, так и в России в целом (до 21,6 на 100 тыс. населения).

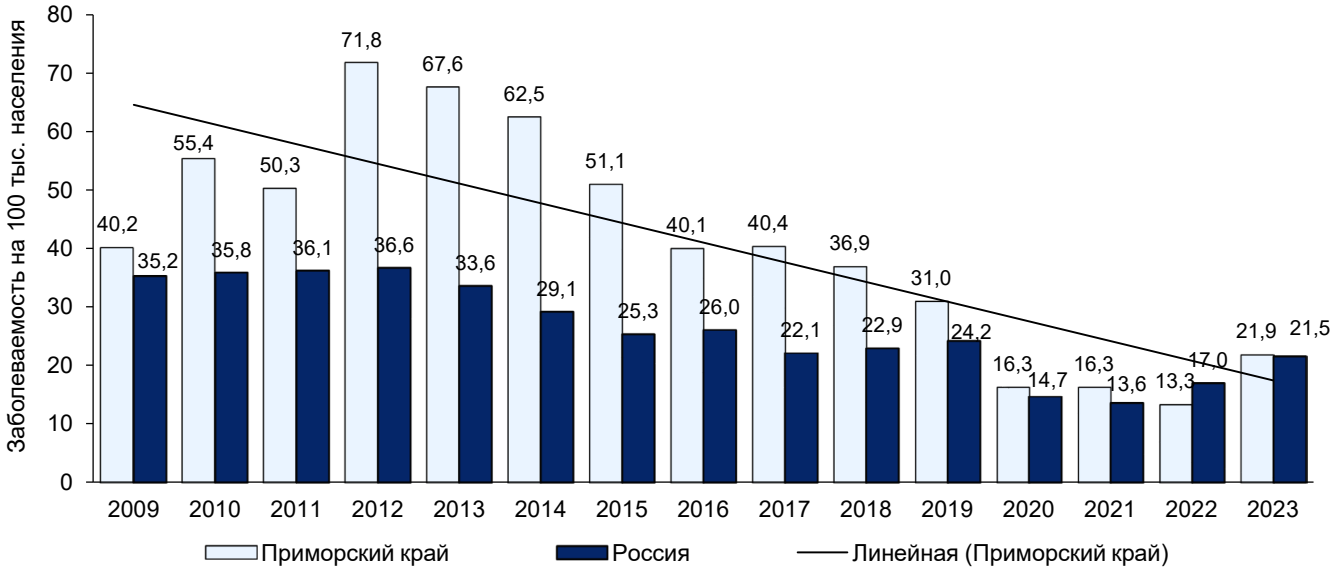


Рис. 1. Динамика заболеваемости сальмонеллёзом в Приморском крае и Российской Федерации в 2009–2023 гг.

До и во время пандемии COVID-19 на территории Приморского края самая низкая заболеваемость сальмонеллёзными инфекциями зафиксирована в муниципальных округах, Тернейском, Кавалеровском, Лазовском, Ольгинском, Партизанском районах и Фокино (**рис. 2**). Следует отметить, что в разгар пандемии на этих территориях штаммы *S. enterica* не были изолированы.

Высокий уровень сальмонеллёзов как до, так и во время пандемии COVID-19 регистрировался в городах Владивосток, Уссурийск, Спасск-Дальний, в Хорольском и Хасанском районах. Период максимального подъёма заболеваемости пришелся на 2019 г., а в 2023 г. зафиксировано постепенное её восстановление до обычного уровня.

В помесячной динамике (**рис. 3**) заболеваемость сальмонеллёзами до и во время пандемии COVID-19 с 2018 по 2019 г. регистрировались преимущественно в летне-осенний период (июнь–октябрь). В разгар пандемии COVID-19, начиная с 2020 г., сезонность сдвинулась на осенние месяцы (сентябрь–октябрь). В 2021 г. максимальные подъёмы заболеваемости сальмонеллёзами пришлись на май и июнь, август и сентябрь, а также ноябрь. В 2023 г. уровень заболеваемости сальмонеллёзами на территории Приморского края стал восстанавливаться, а его сезонность наблюдалась в летне-осенний период (июнь–октябрь). Близкие результаты приводят и другие авторы [4].

Интересные данные были получены при сопряжённом анализе помесячной заболеваемости COVID-19 в одни и те же годы. Так, в динамике заболеваемости COVID-19 и сальмонеллёзами за 2021–2022 гг. (**рис. 4**) можно выделить четыре пе-

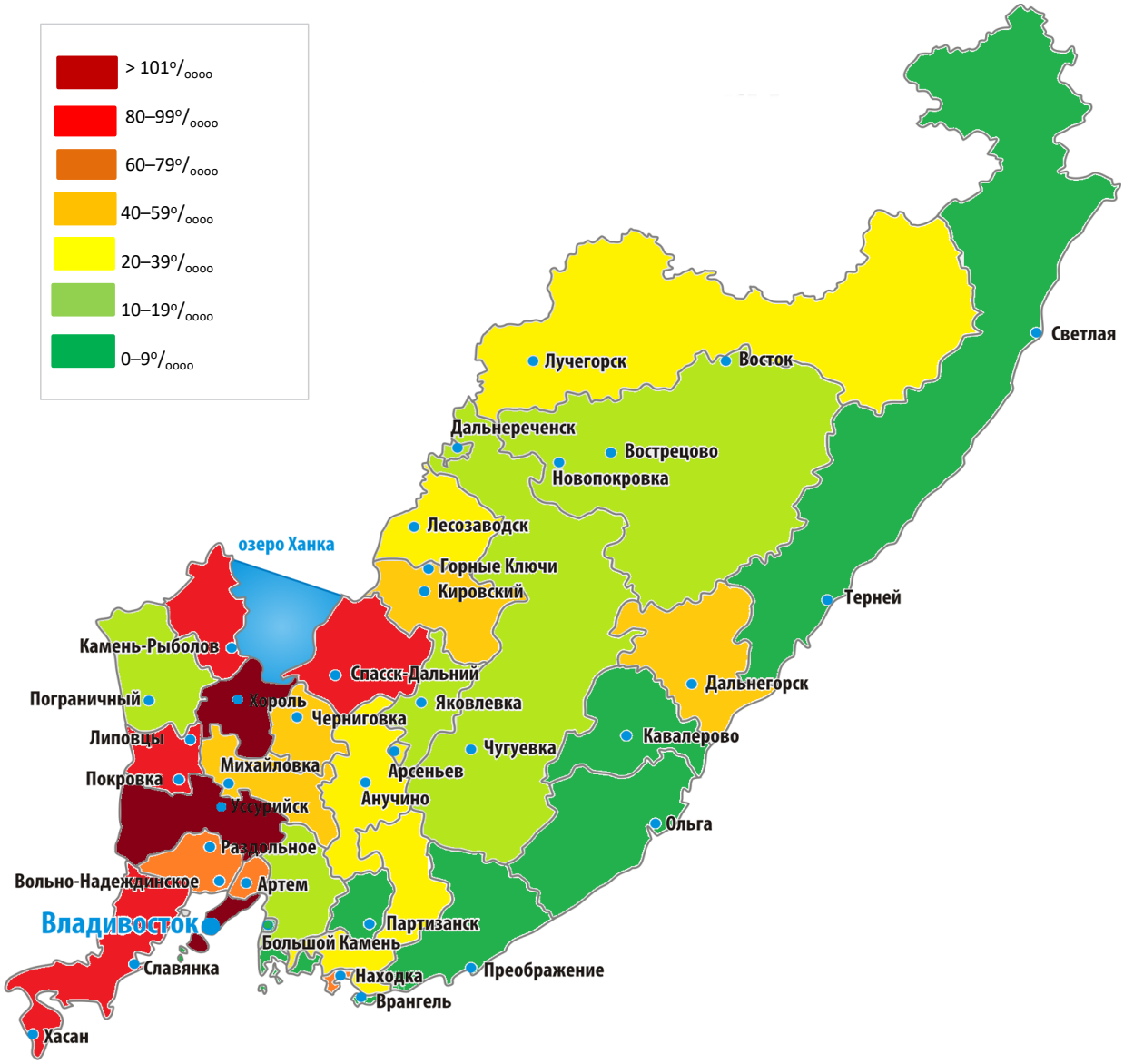


Рис. 2. Заболеваемость сальмонеллёзом на административных территориях Приморского края в 2019–2023 гг. (на 100 тыс. населения).

Цветной вариант рисунка — см. на сайте журнала: https://microbiol.crie.ru/jour

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-679

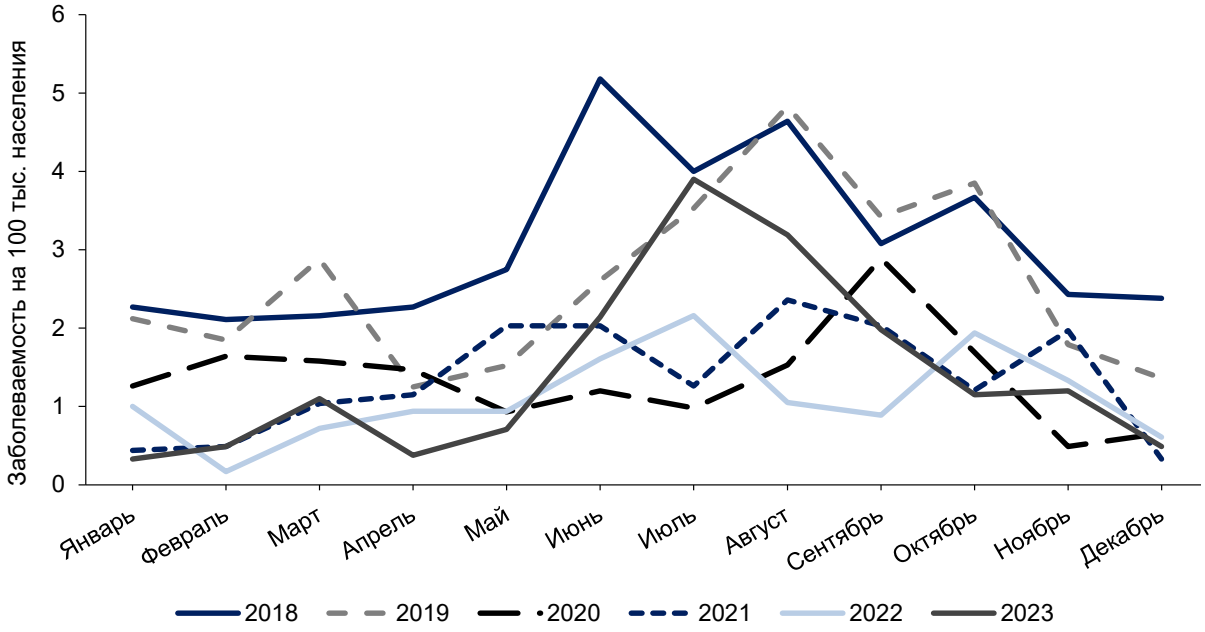


Рис. 3. Помесячная динамика заболеваемости сальмонеллёзом в Приморском крае в 2018–2023 гг.

риода в изменении уровня заболеваемости. С января по октябрь 2021 г. наблюдался спад заболеваемости COVID-19, в то же время заболеваемость сальмонеллёзами возросла. С ноября 2021 г. по март 2022 г. заболеваемость COVID-19 возросла, а сальмонеллёзами с декабря 2021 г. по февраль 2022 г. — снизилась. С марта по июль 2022 г. отмечено значительное увеличение заболеваемости сальмонеллёзами. С августа по сентябрь 2022 г. отмечен подъём заболеваемости COVID-19 при снижении регистрации сальмонеллёзов. Корреляционный анализ приведённых данных по Спирмену позволил выявить обратную связь средней силы между анализируемыми данными помесячной заболеваемости обеими инфекциями ($r = 0,5$; $p < 0,05$).

Установлено, что в Приморском крае, как и в большинстве регионов Российской Федерации, и в мире, лидирующую позицию занимает *Salmonella* серогруппы D с доминирующим серотипом *S. enteritidis*, далее следуют серогруппы C и B с несущественным долевым значением (серогруппа B — 9,1 ± 1,3%; серогруппа C — 9,7 ± 1,3%). Последнее место занимает серогруппа E, которая в 2022 г. не была зарегистрирована. Следует отметить, что наименьшая заболеваемость, вызванная и другими серогруппами *S. enterica*, была зафиксирована в 2022 г. (**рис. 5**).

В современный период основными серотипами при выявлении сальмонеллезов являются *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. infantis*. Начиная с 1995 г. и по настоящее время, несмотря на многообразие плазмидных типов у ведущего серотипа *S. enteritidis*, доминирующее значение по-прежнему имеют три основных плазмидных типа: 38, 38:1,4 и 38:4,4 МДа (**таблице**). Не потеряли свою значимость в формировании эпидемической ситуации и другие, реже выделяемые плазмидные типы (38:2,3, 38:2,3:1,4, 38:2,6:1,4, 38:2,6:14, 38:3,0:1,4, 38:30, 38:30:1,4, 38:30:2,3 МДа — эпидемический пул). Результаты исследования показали, что количество заболевших сальмонеллёзами, вызванными *S. enteritidis* с плазмидными типами 38, 38:1,4, 38:2,3 и 38:4,4 МДа, постепенно снижалось вплоть до 2019 г., а с начала пандемии COVID-19 сократилось в 2 раза (таблица).

Динамика числа плазмидных типов *S. enteritidis*, выделяемых в Приморском крае в 2009–2023 гг.

Плазмидные типы (МДа)	Год															Всего штаммов	Источник выделения
	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023		
38	220	128	110	397	313	234	211	140	93	76	96	41	31	37	26	2153	п, пп, в
38:1,4	297	323	299	343	538	349	309	154	186	138	66	17	17	12	17	3065	п, пп, в
38:2,3	7	5	9	12	8	2	5	7	13	10	11	9	3	2	–	103	п, пп, в
38:4,4	82	368	267	179	111	132	107	137	119	82	50	13	24	1	8	1760	п, пп

Примечание. п — пострадавшие; пп — пищевые продукты; в — внешняя среда.

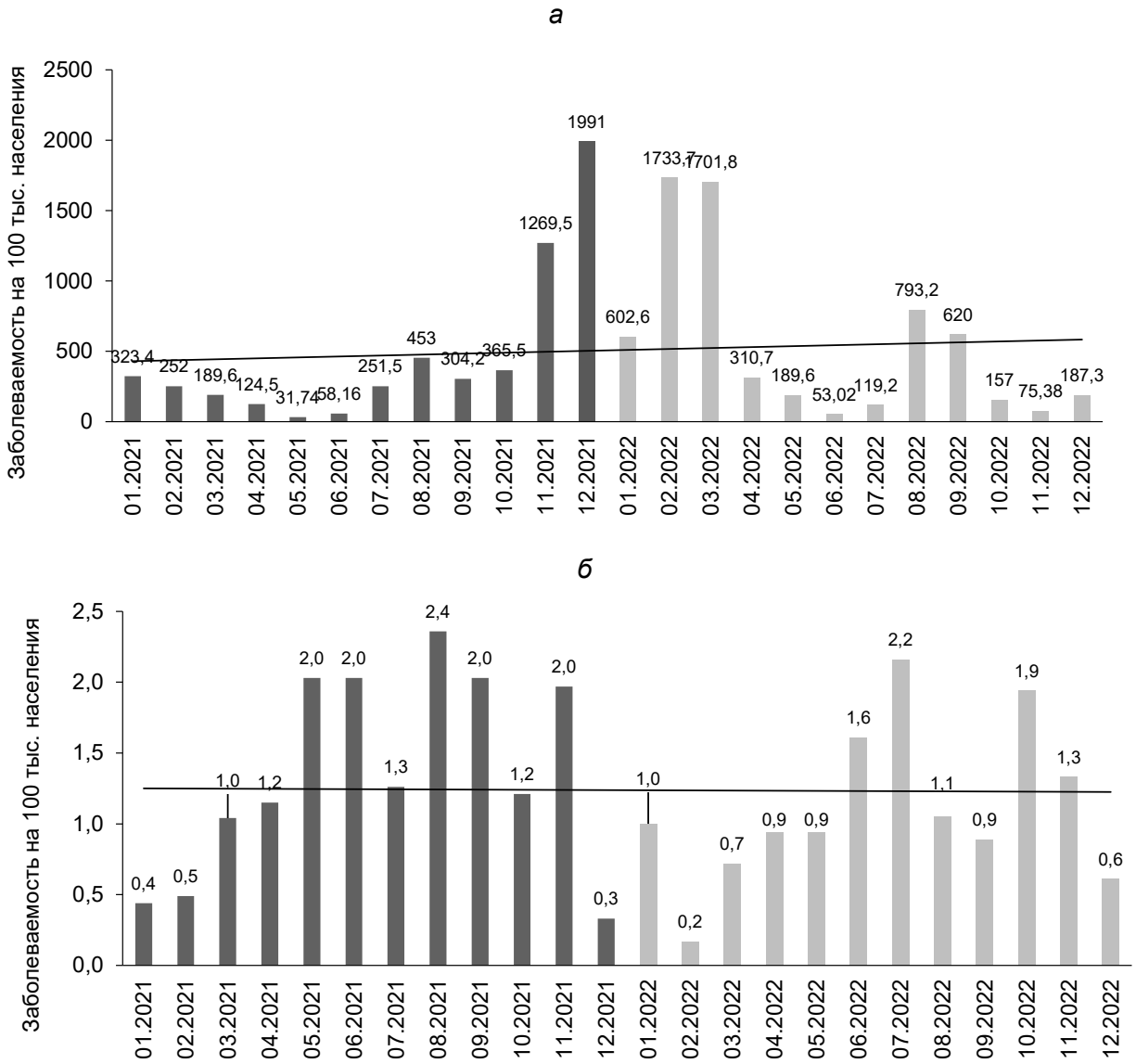


Рис. 4. Сравнительный анализ помесячной динамики заболеваемости COVID-19 (*а*) и сальмонеллёзом (*б*) с 2021 по 2022 г.

Важно отметить, что как до, так и в период пандемии COVID-19 у серовара *S. enteritidis* выявлялись редкие варианты плазмидных типов: 38:26:2,6, 3,2:2,0, 38:3,8:3,0, 5,6:3,8:3,2:2,0, 38:4,4:3,2 50:38:20, 38:5,0:3,8:3,0 и 50:8,0:4,0:3,5:1,4 МДа. Влияние эпидемиологической ситуации во время пандемии COVID-19 на появление новых плазмидных типов нами не установлено.

Вторым по значимости серотипом в этиологии сальмонеллёзов в Приморском крае является *S. typhimurium*. За 2019–2023 гг. исследовано более 90 штаммов *S. typhimurium*, изолированных из различных источников. Все заражения носили пищевой характер, госпитальные штаммы не были выделены. Наиболее часто регистрировались штаммы с одним плазмидным типом — 60 МДа (14,3%), вторым по значимости оказался плазмидный тип 4,0:3,2 МДа (13,2%), впервые появившийся в 2015 г. (выделен от больного в г. Уссурийске).

У серотипа *S. infantis*, циркулирующего на территории Приморского края, в основном преобладал плазмидный тип массой 100 МДа (72%), выделенный из продуктов питания. Штаммы с другими плазмидными типами изолировались редко.

Обсуждение

Кишечные инфекции являются актуальной проблемой во всём мире ввиду чрезвычайно широкой распространённости данной патологии, высокого уровня заболеваемости и, как следствие, значительного экономического ущерба [12].

Сальмонеллёзные инфекции и COVID-19 имеют разные пути передачи, но в отдельных случаях проявляют сопоставимые симптомы [13, 14]. Кроме

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-679

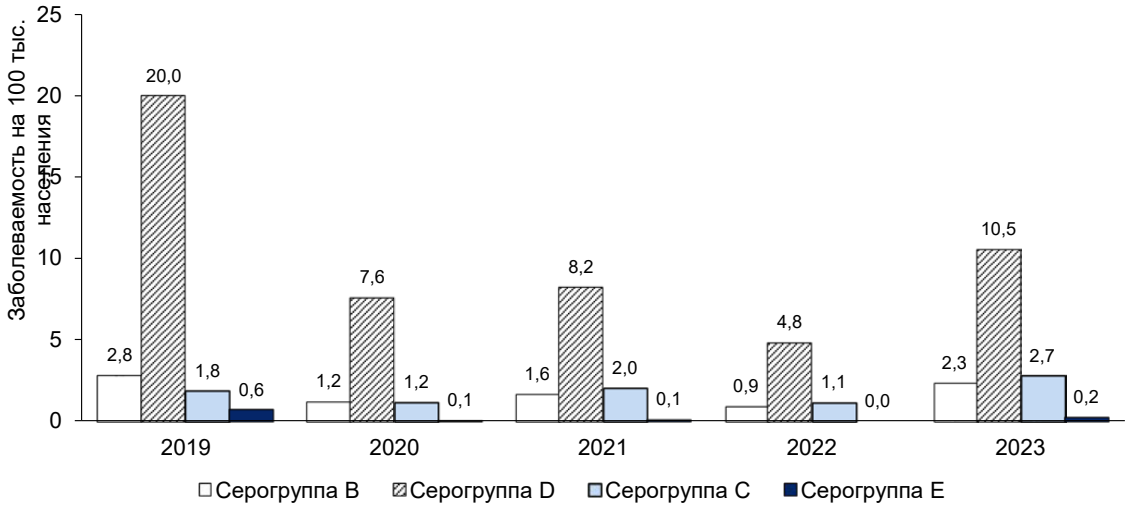


Рис. 5. Динамика заболеваемости населения отдельными серогруппами *Salmonella enterica* в Приморском крае за 2019–2023 гг.

того, иммунологический ответ, который вызывает вирус SARS-CoV-2, способен повлиять на степень тяжести бактериальных инфекций, в том числе сальмонеллёзов [15]. Позднее было установлено, что эти факторы имеют серьёзные последствия, связанные с возникновением и лечением сальмонеллёзов [16–19]. Случаи коинфекции сальмонеллой и COVID-19 зарегистрированы в 9 исследованиях по всему миру [20], некоторые из них были обнаружены у пациентов из Пакистана [21], Турции [22] и Японии [23]. Пациенты с коинфекцией сталкиваются с более серьёзными последствиями и увеличивают сложность терапевтических решений, необходимых для решения этой проблемы.

В 2020 г. развитие пандемии COVID-19 во всём мире существенно повлияло на показатели заболеваемости другими инфекциями с разным механизмом передачи. Так, при сравнении со среднемноголетним показателем с 2016 по 2023 г. уровень заболеваемости инфекциями с аэрозольным механизмом передачи с 2020 по 2023 г. в Приморском крае был выше среднемноголетнего, тогда как показатели заболеваемости кишечными инфекциями — значительно ниже. Наименьшие показатели регистрировались в 2020–2021 гг., однако в последующие годы отмечается тенденция к их росту.

Показатели заболеваемости инфекциями с трансмиссивным механизмом передачи за 2020–2023 гг. также были значительно ниже среднемноголетних. Аналогичные данные получены и по заболеваемости инфекциями с контактным механизмом.

Установлено, что во всех группах, за исключением инфекций с аэрозольным механизмом передачи, заболеваемость в годы пандемии COVID-19, по сравнению со средними показателями за предыдущие годы, существенно снизилась.

Сальмонеллёзы в Приморском крае продолжают играть важную роль в формировании инфекционной заболеваемости, о чём свидетельствуют увеличение вспышек и превышение среднего уровня заболеваемости по сравнению с Россией в целом. Следует отметить, что в разгар пандемии COVID-19 наблюдалось снижение роста заболеваемости сальмонеллёзами. Самая низкая заболеваемость зарегистрирована в Тернейском, Кавалеровском, Лазовском, Ольгинском, Партизанском районах и Фокино, однако в городах Владивосток, Уссурийск, Спасск-Дальний, Хорольском, Хасанском районах отмечен высокий уровень сальмонеллёзов. В период пандемии отмечен разнонаправленный характер в помесячной динамике заболеваемости COVID-19 и сальмонеллёзами по сравнению с допандемическим периодом. Снижение регистрации случаев сальмонеллёзов, возможно, связано с изоляцией населения в период пандемии, переходом на удаленный формат работы, переводом на карантин многопрофильных медицинских организаций в связи с выявлением случаев заболеваемости коронавирусной инфекцией и перепрофилированием клинических больниц для диагностики и специализированного лечения больных с подтверждённым диагнозом. Тем не менее в формировании сложившейся эпидемиологической ситуации нельзя исключить и влияние биогеоценоза на саморегуляцию различных видов микроорганизмов в результате интеграционно-конкурентных взаимоотношений между ними, что отражается на изменении тенденции в динамике заболеваемости отдельными инфекциями и структуры инфекционной патологии [24, 25].

Несмотря на многообразие плазмидных типов у ведущего серотипа *S. enteritidis*, доминирующее значение в развитии заболеваемости сальмонеллёзом имеют три основных плазмидных типа: 38,

38:1,4 и 38:4,4 МДа, что подтверждается результатами исследования. Установлено, что сальмонеллёзные инфекции в Приморском крае как в допандемический период, так и в разгар пандемии COVID-19 в основном были вызваны штаммами *S. enteritidis* с плазмидной характеристикой 38, 38:1,4, 38:2,3 и 38:4,4 МДа. Как и в допандемический период, были выявлены и редкие варианты плазмидных типов. Влияние эпидемической ситуации во время пандемии COVID-19 на появление новых плазмидных типов не установлено.

Заключение

Полученные нами данные об эпидемиологических и молекулярно-биологических характеристиках возбудителей сальмонеллёзов, циркулирующих в Приморском крае в допандемический период и в разгар пандемии COVID-19, открывают перспективы для раскрытия эколого-эпидемиологических закономерностей развития эпидемического процесса, что позволит обоснованно принимать управленческие решения для реализации контроля за сальмонеллёзной инфекцией.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Naushad S., Ogunremi D., Huang H. *Salmonella — perspectives for low-cost prevention, control and treatment.* IntechOpen; 2024. DOI: https://doi.org/10.5772/intechopen.112948
2. Яковлев А.А., Чекунина С.Н., Колпаков С.Л. *Эпидемиологическая оценка факторов, детерминирующих эпидемический процесс гепатита А и шигелезов (на модели Приморского края)*. Владивосток;2020. Yakovlev A.A., Chekunina S.N., Kolpakov S.L. *Epidemiological Assessment of the Factors that Determine the Epidemic Process of Hepatitis A and Shigellosis (on the Model of Primorsky Krai).* Vladivostok;2020. EDN: https://elibrary.ru/kkjyzk
3. Пшеничная Н.Ю., Гопаца Г.В., Углева С.В. и др. Эпидемиологические аспекты респираторных инфекций верхних и нижних отделов дыхательных путей в период пандемии COVID-19. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы* 2022;12(4):72–6. Pshenichnaya N.Yu., Gopatsa G.V., Ugleva S.V., et al. Epidemiological aspects of respiratory infections of the upper and lower respiratory tract during the COVID-19 pandemic. *Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items.* 2022;12(4):72–6. DOI: https://doi.org/10.18565/epidem.2022.12.4.72-6 EDN: https://elibrary.ru/ydeanh
4. Любимова А.В., Сатосова Н.В., Кицбабашвили Р.В. Особенности эпидемического процесса сальмонеллёзной инфекции в период пандемии COVID-19. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2023;22(2):95–102. Lyubimova A.V., Satosova N.V., Kitsbabashvili R.V. Salmonellosis in the COVID-19 pandemic era. *Epidemiology and Vaccinal Prevention.* 2023;22(2):95–102. DOI: https://doi.org/10/31631/2073-3046-2023-22-2-95-102 EDN: https://elibrary.ru/nzieml
5. Лаврик Е.П., Кравченко А.Г., Трухина Г.М. и др. Влияние противоэпидемических (карантинных) мероприятий в условиях пандемии COVID-19 на снижение и рапрстранение инфекций с аэрогенным механизмом передачи (на примере ветряной оспы). *Здоровье населения и среда обитания – ЗНиСО.* 2021;29(8):55–62. Lavrik E.P., Kravchenko A.G., Trukhina G.M., et al. Reducing effects of antiepidemic (quarantine) measures during the COVID-19 pandemic on the incidence and spread of airborne infectious diseases (based on the example of varicella). *Public Health and Life Environment – PH&LE*. 2021;29(8):55–62. DOI: https://doi.org/10.35627/2219-5238/2021-29-8-55-62 EDN: https://elibrary.ru/nyeste
6. Бутакова Л.В., Сапега Е.Ю., Троцено О.О. и др. Анализ заболеваемости энтеровирусной инфекцией в субъектах Дальневосточного и Сибирского Федеральных округов Российской Федерации в период пандемии COVID-19 в 2020 году. Прогнозирование заболеваемости энтеровирусной инфекцией на 2021 г. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии.* 2021;(40):66–71. Butakova L.V., Sapega E.Yu., Trotseno O.O., et al. Analysis of enterovirus infection incidence in constituent entities of the Far Eastern and Siberian federal districts of the Russian federation during COVID-19 pandemic in year 2020. Enterovirus infection incidence prognosis for year 2021. *Far Eastern Journal of Infectious Pathology*. 2021;(40):66–71. EDN: https://elibrary.ru/uyuuao
7. Кандрычын С.В. Выявление случаев туберкулеза и других инфекций во время пандемии COVID-19. *Туберкулез и болезни легких*. 2021;99(4):66–8. Kandrychyn S.V. Detection of tuberculosis and other infections during the COVID-19 pandemic. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2021;99(4):66–8. DOI: https://doi.org/10.21292/2075-1230-2021-99-4-66-68 EDN: https://elibrary.ru/ocwfnf
8. Щелканов М.Ю. Этиология COVID-19. В кн.: *COVID-19: от этиологии до вакцинопрофилактики.* М.;2023. Shchelkanov M.Yu. Etiology of COVID-19. In: *COVID-19: from Etiology to Vaccine Prevention.* Moscow;2023. DOI: https://doi.org/10.33029/9704-9767-4-COV-2023-1-288
9. 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(10):19–35. Popova A.Y., Shchelkanov M.Y., 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(10):19–35. DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-497 EDN: https://elibrary.ru/pujffa
10. Cado C.I., Liu S.T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol*. 1981;145(3):1365–73. DOI: https://doi.org/10.1128/jb.145.3.1365-1373.1981
11. Popoff M.Y., Bockemühl J., Gheesling L.L. Supplement 2002 (No 46) to the Kauffmann–White scheme. *Res. Microbiol*. 2004;155(7):568–70. DOI: https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.04.005
12. Раков А.В., Шубин Ф.Н., Иванис В.А. и др. Сравнительная характеристика сальмонеллеза, вызванного различными плазмидоварами Salmonellaenteritidis. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2001;(5):50–4. Rakov A.V., Shubin F.N., Ivanis V.A., et al. Comparative characteristics of salmonellosis caused by different plasmid variants of Salmonella enteritidis. *Epidemiology and Infectious Diseases*. 2001;(5):50–4.
13. Lin L., Jiang X., Zhang Z., et al. Gastrointestinal symptoms of 95 cases with SARS-CoV-2 infection. *Gut*. 2020;69(6):997–1001. DOI: https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-321013
14. Abdul Aziz J.M., Abdullah S.K., Al-Ahdal T.M.A., et al. Diagnostic bias during the COVID-19. A rare case report of *Salmonella Typhi*. *Ann. Med. Surg*. 2022;74:103282. DOI: https://doi.org/10.1016/j.amsu.2022.103282
15. Bengoechea J.A., Bamford C.G.G. SARS-CoV-2, bacterial co-infections, and AMR: the deadly trio in COVID-19? *EMBO Mol. Med*. 2020;12:e12560. DOI: https://doi.org/10.15252/emmm.202012560
16. Onyeaka H., Mazi I.M., Oladunjoye I.O., et al. Impact of COVID-19 on foodborne illness in Africa – a perspective piece. *J. Infect Public Health*. 2023;16(5):651–9. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jiph.2023.02.018

17. Mughini-Gras L., ChanamépPinedo L., Pijnacker R., et al. Impact of the COVID-19 pandemic on human salmonellosis in the Netherlands. *Epidemiol. Infect*. 2021;149:e254. DOI: https://doi.org/10.1017/S0950268821002557
18. Davis B.P., Amin J., Franklin N., Beggs P.J. Salmonellosis in Australia in 2020: possible impacts of COVID-19 related public health measures. *Commun. Dis. Intell*. 2022;46:1–17. DOI: https://doi.org/10.33321/cdi.2022.46.2
19. Prayoga W. Concurrent emergencies: overlapping Salmonella and COVID-19 concerns in public health strategies and preparedness. *Front. Public Health*. 2024;12:1331052. DOI: https://doi.org/10.3389/fpubh.2024.1331052
20. Rawson T.M., Moore L.S.P., Zhu N., et al. Bacterial and fungal coinfection in individuals with coronavirus: a rapid review to support COVID-19 antimicrobial prescribing. *Clin. Infect. Dis*. 2020;71(9):2459–68. DOI: https://doi.org/10.1093/cid/ciaa530
21. Haqqi A., Khurram M., Din M.S.U., et al. COVID-19 and Salmonella Typhi co-epidemics in Pakistan: a real problem. *J. Med. Virol*. 2021;93(1):184–6. DOI: https://doi.org/10.1002/jmv.26293
22. Ürkmez F.Y., Atalay T. Salmonella bacteremia accompanying COVID-19: The first salmonella co-infection in the world unrelated to Pakistan. *Mikrobiyol. Bul*. 2022;56(2):357–64. DOI: https://doi.org/10.5578/mb.20229814 (in Turkish)
23. Yogo A., Yamamoto S., Iwamoto N., et al. Non-typhoidal Salmonella bacteremia in COVID-19 with recrudescence of fever after corticosteroid discontinuation: A case report. *IDCases*. 2022;27:e01415. DOI: https://doi.org/10.1016/j.idcr.2022.e01415
24. Шмальгаузен И.И. *Кибернетические вопросы биологии*. Новосибирск;1968. Shmalgauzen I.I. *Cybernetic Issues of Biology.* Novosibirsk;1968.
25. Яковлев А.А., Поздеева Е.С. О возможных механизмах саморегуляции паразитарных систем в биогеоценозе. *Вестник Российской академии медицинских наук.* 2018;73(3):195–205. Yakovlev A.A., Pozdeeva E.S. On possible mechanisms of self-regulation of parasitic systems in biogeocenosis. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2018;73(3):195–205. DOI: https://doi.org/10.15690/vramn880 EDN: https://elibrary.ru/utykry

Информация об авторах

Показеева Юлия Николаевна✉ — м. н. с. лаб. кишечных инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток, Россия; ассистент каф. нормальной и патологической физиологии Тихоокеанского медицинского университета, Владивосток, Россия, pokazeeva_ylia@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-5725-830X

Семейкина Любовь Михайловна — аспирант НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток, Россия; зам. зав. отделом эпидемиологии Центра гигиены и эпидемиологии в Приморском крае, Владивосток, Россия, https://orcid.org/0009-0002-1095-7968

Яковлев Анатолий Александрович — д. м. н., в. н. с. лаб. кишечных инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток, Россия; проф. каф. эпидемиологии и военной эпидемиологии Тихоокеанского медицинского университета, Владивосток, Россия, https://orcid.org/0000-0002-7008-3804

Тимченко Нелли Фёдоровна — д. м. н., в. н. с. лаб. кишечных инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток, Россия, https://orcid.org/0000-0001-6051-292X

Макаренкова Илона Дамировна — д. м. н., в. н. с. лаб. кишечных инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток, Россия, https://orcid.org/0000-0001-6450-840X

Щелканов Михаил Юрьевич — д. б. н., член-корреспондент РАН, директор НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток, Россия; зав. каф. эпидемиологии, микробиологии и паразитологии Дальневосточного федерального университета, Владивосток, Россия, https://orcid.org/0000-0001-8610-7623

Вклад авторов: *Показеева Ю.Н.* — дизайн исследования, методология, экспериментальная часть, сбор и анализ данных, визуализация, написание статьи; *Семейкина Л.М.* — сбор и анализ данных; *Яковлев А.А.; Тимченко Н.Ф., Макаренкова И.Д., Щелканов М.Ю.* — концепция исследования, написание и редактирование 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 20.04.2025;
принята к публикации 24.06.2025;
опубликована 28.08.2025

Information about the authors

Yulia N. Pokazeeva✉ — junior researcher, Laboratory of intestinal infections, G.P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia; assistant, Department of normal and pathological physiology, Pacific Medical University, Vladivostok, Russia, pokazeeva_ylia@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-5725-830X

Lyubov M. Semeykina — postgraduate student, G.P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia; Deputy head, Epidemiology department, Center for Hygiene and Epidemiology in Primorsky Krai, Vladivostok, Russia, https://orcid.org/0009-0002-1095-7968

Anatoly A. Yakovlev — Dr. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of intestinal infections, G.P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia; professor, Department of epidemiology and military epidemiology, Pacific Medical University, Vladivostok, Russia, https://orcid.org/0000-0002-7008-3804

Nelli F. Timchenko — Dr. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of intestinal infections, G.P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia, https://orcid.org/0000-0001-6051-292X

Ilona D. Makarenkova — Dr. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of intestinal infections, G.P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia, https://orcid.org/0000-0001-6450-840X

Mikhail Yu. Shchelkanov — Dr. Sci. (Biol.), Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Director, G.P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia; Head, Department of epidemiology, microbiology and parasitology, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia, https://orcid.org/0000-0001-8610-7623

Authors' contribution: *Pokazeeva Yu.N.* — study design, methodology, experimental part, data collection and analysis, visualization, writing of the article; *Semeykina L.M.* — data collection and analysis; *Yakovlev A.A., Timchenko N.F., Makarenkova I.D., Shchelkanov M.Yu.* — study concept, writing and editing of the article. All authors confirm that their authorship meets the criteria of the International Committee of Medical Journal Editors, made a significant contribution to the search and analytical work and preparation of the article, read and approved the final version before publication.

The article was submitted 20.04.2025;
accepted for publication 24.06.2025;
published 28.08.2025

Оригинальное исследование
https://doi.org/10.36233/0372-9311-654

Итоги рекогносцировочного эпизоотологического мониторинга лихорадки Западного Нила на отдельных территориях европейской части России и Урала в 2024 году

Бородай Н.В.✉, Несговорова А.В., Мендыгалиева А.К., Колоскова А.Ю., Удовиченко С.К., Зарубин Н.А., Каргашин С.А., Гусев Е.А., Батурин А.А., Хабарова И.А., Путинцева Е.В., Топорков А.В.

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Волгоград, Россия

Аннотация

Актуальность. Потепление климата способствует интенсификации эпизоотического и эпидемического процессов лихорадки Западного Нила (ЛЗН). На юге России активность эпизоотического процесса регистрируют ежегодно, но в центральном регионе европейской части страны и на Урале энзоотическая циркуляция вируса Западного Нила (ВЗН) не подтверждена на территории 20 субъектов.

Цель работы — исследовать зоолого-энтомологический материал на инфицированность ВЗН для подтверждения течения эпизоотического процесса в «старых» очагах ЛЗН и на ранее неэндемичных территориях.

Материалы и методы. Полевой материал собирали в 2024 г. в 19 субъектах в соответствии с регламентированными в нормативных документах методами. Исследование материала проводили методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией.

Результаты. Всего в полевой сезон 2024 г. исследовано 5419 проб полевого материала: 684 пробы птиц 74 видов, 455 проб мелких млекопитающих 13 видов, 45 проб лягушек 1 вида, 3665 проб кровососущих комаров 33 видов (93 438 экземпляров), 570 проб иксодовых клещей 17 видов (4809 экземпляров). Маркеры ВЗН в полевом материале обнаружены в 7 субъектах из 3 федеральных округов. В Кировской, Челябинской областях и Республике Мордовия доказательства течения эпизоотического процесса ЛЗН получены впервые. РНК ВЗН выявлена в 6 (0,5%) из 1184 исследованных проб позвоночных животных и в 27 (0,6%) из 4235 проб членистоногих. Уровень индивидуальной заражённости кровососущих комаров составил 0,03%, иксодовых клещей — 0,06%, птиц — 0,9%.

Выводы. Результаты исследований подтверждают энзоотичную циркуляцию ВЗН на территории Южного, Приволжского и Уральского федеральных округов.

Ключевые слова: *лихорадка Западного Нила, вирус Западного Нила, эпизоотический процесс, инфицированность, природный резервуар, переносчики*

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). Исследование одобрено комитетом по биоэтике Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора (протокол № 1 от 14.01.2024).

Благодарность. Авторы выражают благодарность сотрудникам органов и учреждений Роспотребнадзора в субъектах РФ, принимавшим участие в организации работ и сборе зоолого-энтомологического материала.

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: Бородай Н.В., Несговорова А.В., Мендыгалиева А.К., Колоскова А.Ю., Удовиченко С.К., Зарубин Н.А., Каргашин С.А., Гусев Е.А., Батурин А.А., Хабарова И.А., Путинцева Е.В., Топорков А.В. Итоги рекогносцировочного эпизоотологического мониторинга лихорадки Западного Нила на отдельных территориях европейской части России и Урала в 2024 году. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2025;102(4):413–424.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-654
EDN: https://www.elibrary.ru/VMOBYD

© Бородай Н.В., Несговорова А.В., Мендыгалиева А.К., Колоскова А.Ю., Удовиченко С.К., Зарубин Н.А., Каргашин С.А., Гусев Е.А., Батурин А.А., Хабарова И.А., Путинцева Е.В., Топорков А.В., 2025

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-654
ORIGINAL RESEARCHES

Original Study Article
https://doi.org/10.36233/0372-9311-654

Results of reconnaissance epizootiological monitoring for West Nile fever in certain regions of European Russia and the Urals in 2024

Natalia V. Borodai✉, Anna V. Nesgovorova, Aina K. Mendygalieva, Anna Yu. Koloskova, Svetlana K. Udovichenko, Nikolay A. Zarubin, Stanislav A. Kargashin, Yevgeny A. Gusev, Artem A. Baturin, Irina A. Khabarova, Elena V. Putintseva, Andrey V. Toporkov

Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russia

Abstract

Introduction. Climate warming contributes to the intensification of epizootic and epidemic processes of West Nile fever (WNF). In southern Russia, the activity of the epizootic process is recorded annually, but in the central region of the European part of the country and in the Urals, the enzootic circulation of the West Nile virus (WNV) has not been confirmed in the territory of 20 subjects.

The aim of the study is to investigate zoological and entomological material for WNV infection to confirm the ongoing epizootic process in old WNV foci and in previously non-endemic areas.

Materials and methods. Field samples were collected in 2024 in 19 subjects in accordance with the methods regulated in normative documents. The material was studied using the reverse transcription polymerase chain reaction method.

Results. In total, during the 2024 field season, 5,419 samples of field samples were examined: 684 samples of birds from 74 species, 455 samples of small mammals from 13 species, 45 samples of frogs from 1 species, 3,665 samples of blood-sucking mosquitoes from 33 species (93,438 specimens), and 570 samples of ixodid ticks from 17 species (4,809 specimens). Markers of WNV in field samples were detected in 7 subjects from 3 federal districts. In the Kirov and Chelyabinsk regions and the Republic of Mordovia, evidence of the ongoing epizootic process of WNF has been obtained for the first time. WNV RNA was detected in 6 (0.5%) out of 1184 tested samples of vertebrate animals and in 27 (0.6%) out of 4235 samples of arthropods. The level of individual infection was 0.03% in blood-sucking mosquitoes, 0.06% in ixodid ticks, and 0.9% in birds.

Conclusion. The results of the studies confirm the enzootic circulation of WNV in the territories of the Southern, Volga and Ural Federal Districts.

Keywords: *West Nile fever, West Nile virus, epizootic process, infection, natural reservoir, vectors*

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 study was approved by the Bioethics Committee of the Volgograd Plague Control Research Institute (Protocol No. 1 dated January 14, 2024).

Acknowledgement. The authors are grateful to the staff of the bodies and institutions of Rospotrebnadzor in the entities who participated in the organization of work and the collection of zoological and entomological material.

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: Borodai N.V., Nesgovorova A.V., Mendygalieva A.K., Koloskova A.Yu., Udovichenko S.K., Zarubin N.A., Kargashin S.A., Gusev Ye.A., Baturin A.A., Khabarova I.A., Putintseva E.V., Toporkov A.V. Results of reconnaissance epizootiological monitoring for West Nile fever in certain regions of European Russia and the Urals in 2024 *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2025;102(4):413–424.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-654
EDN: https://www.elibrary.ru/VMOBYD

Введение

Лихорадка Западного Нила (ЛЗН) — энзоотичное природно-очаговое трансмиссивное инфекционное заболевание, возбудителем которого является вирус Западного Нила (ВЗН) из рода *Orthoflavivirus*. Резервуарный хозяин возбудителя инфекции — птицы, переносчики — кровососущие комары [1].

Потепление климата за последние десятилетия способствовало трансформации многих экосистем на планете, что повлекло за собой изменения в естественной среде обитания различных видов животных, в том числе резервуаров и переносчиков ВЗН. Повышение температуры приводит к увеличению скорости репликации возбудителя, удлинению периода пребывания перелётных птиц в местах гнездования, а также ускоренному развитию, увеличению сроков активности и расширению ареалов кровососущих комаров-переносчиков [2, 3]. Всё это способствует интенсификации эпизоотического и эпидемического процессов ЛЗН на при-

© Borodai N.V., Nesgovorova A.V., Mendygalieva A.K., Koloskova A.Yu., Udovichenko S.K., Zarubin N.A., Kargashin S.A., Gusev Ye.A., Baturin A.A., Khabarova I.A., Putintseva E.V., Toporkov A.V., 2025

родно-очаговых территориях и расширению ареала циркуляции ВЗН.

Целенаправленный мониторинг инфицированности популяций резервуаров и переносчиков даёт возможность выявить признаки активизации эпизоотического процесса, своевременно провести мероприятия по снижению численности переносчиков и информировать население о необходимости применения средств индивидуальной и коллективной защиты от укусов комаров. Кроме того, эффективный мониторинг позволяет осуществлять динамические наблюдения за активностью природных очагов ЛЗН.

В начале изучения ЛЗН общеприняты были представления о том, что ареал ВЗН ограничен только территориями экваториального, субэкваториального, тропического, субтропического и южной части умеренного климатических поясов. На территории бывшего СССР он охватывал юг европейской части России, Белоруссию, Молдавию, Украину, Азербайджан, Грузию, Таджикистан, Киргизию, Казахстан, Туркменистан. Впервые в СССР вирус был выделен в 1963 г. из иксодовых клещей *Hyalomma plumbeum* (совр. *Hyalomma marginatum*) в Астраханской области, а также поползня и чёрного дрозда из Азербайджана [4]. В 1980-х гг. возбудитель был обнаружен в регионах, расположенных значительно севернее: в грачах и нидиколах их гнёзд из Омской области, в нидиколах из Новосибирской области [5], комарах *Aedes vexans* из Республики Татарстан [6]. Во время вспышки ЛЗН в Москве в 2021 г. при исследовании полевого материала РНК ВЗН была выявлена в 14,2% проб от общего количества исследованных кровососущих комаров, 68,0% особей павших и 32,0% живых птиц [7]. Полученные данные свидетельствовали о более широком территориальном распространении возбудителя ЛЗН, чем было принято ранее [8]. По состоянию на начало 2024 г. на территории Российской Федерации маркеры ЛЗН выявлены в материале от носителей и переносчиков в 52 субъектах. На юге России активность эпизоотического процесса регистрируют ежегодно. Вместе с тем обращает на себя внимание отсутствие положительных находок в некоторых субъектах центрального региона европейской части России и на Урале — энзоотическая циркуляция ВЗН не подтверждена на территории 10 субъектов Центрального федерального округа (ЦФО), 6 — Приволжского (ПФО), 4 — Уральского (УФО). На некоторых из таких «молчащих» территорий выявлены местные случаи заболевания людей ЛЗН, что указывает на наличие очагов этой арбовирусной инфекции. Поэтому проведение активных рекогносцировочных обследований, направленных на уточнение нозоареала, является актуальным.

Цель настоящей работы — исследовать зоолого-энтомологический материал на инфицированность ВЗН для подтверждения течения эпизоотического процесса в «старых» очагах ЛЗН и на ранее неэндемичных территориях.

Материалы и методы

Сбор полевого материала для исследований на базе Референс-центра по мониторингу за возбудителем ЛЗН в сезон 2024 г. осуществлён с апреля по ноябрь в 19 субъектах РФ (**рисунок**) сотрудниками ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, а также противочумными учреждениями и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъектах РФ. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010).

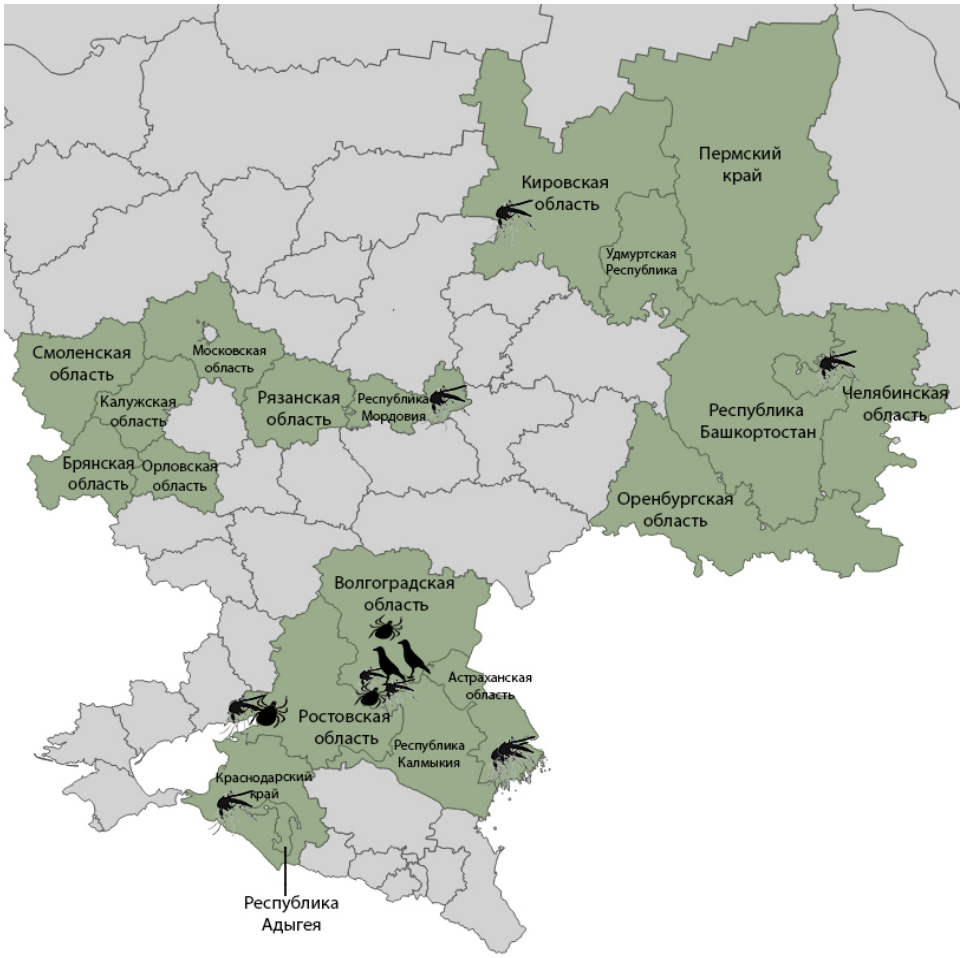
Отлов мелких млекопитающих осуществляли ловушками Геро. Птиц добывали сотрудники охотничьих хозяйств отстрелом, сбор павших особей проводили сотрудники зоогрупп и научные сотрудники. Отбор проб кровососущих комаров в открытых биотопах на приусадебных участках, берегах водоёмов, кладбищах, в лесах осуществляли с помощью автоматических ловушек «BG-sentinel-2» («Biogents AG»), «ЛовКом» («ПроТехноСистемс»), «Mosquito Magnet Executive» («Woodstream»), «Black Kill M3000» («Black Kill») и энтомологического сачка. В закрытых биотопах (птичники, хлева, подвалы многоэтажных домов) комаров отлавливали с помощью эксгаустеров и аккумуляторных пылесосов: «BLV 18-200» («Karcher») и «Tefal X-PERT 3.60 Versatile Handstick TY6975WO» («Tefal»). Сбор иксодовых клещей проводили классическими методами: в природе — энтомологическим флагом по растительности, в населённых пунктах — с животных (мелкий и крупный рогатый скот, собаки, кошки).

Собранных членистоногих доставляли в термоконтейнерах с аккумуляторами холода в лабораторию, определяли с помощью стереомикроскопов «Stemi 2000C» («Karl Zeiss») и «МСП-1» («ЛОМО») на охлаждённой поверхности до вида по стандартным ключам [9–12]. Пулировали членистоногих в криопробирки объёмом 2 мл.

Транспортировали полевой материал на сухом льду или в автомобильных холодильниках при –20°C. Для анализа климатических факторов использовали данные Федеральной службы по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды в Российской Федерации[1].

[1] Информационный бюллетень Федеральной службы по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды: обзор состояния и тенденции изменения климата России 2024 год. (декабрь 2023 — ноябрь 2024). URL: http://downloads.igce.ru/

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-654



Субъекты, на территории которых проведён отбор проб зоолого-энтомологического материала в 2024 г., и точки выявления положительных находок РНК ВЗН от птиц и членистоногих.

Полевой материал исследовали методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией на стационарной лабораторной базе Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора. Для экстракции РНК ВЗН готовили суспензии кровососущих членистоногих, а также органов птиц, мелких млекопитающих и лягушек (в объединённой пробе от каждой особи — головной мозг, почки, селезёнка). Обнаружение РНК ВЗН проводили с использованием набора реагентов «АмплиСенс WNV-FL» (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) в соответствии с инструкцией производителя. Определение генотипа ВЗН в положительных пробах осуществляли посредством набора реагентов «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4» (Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора).

Инфицированность позвоночных определяли путём выделения доли положительных проб от общего объёма исследованных (в %), индивидуальную инфицированность членистоногих — по формуле В.Н. Беклемишева [13]. Статистическую обработку материалов и вычисления проводили в программе «Microsoft Excel».

climate_change_2/monitoring-klimata/Russia/2024/2024.pdf

Результаты

Всего в полевой сезон 2024 г. исследовано 5419 проб полевого материала: 684 пробы птиц 74 видов, 455 проб мелких млекопитающих 13 видов, 45 проб лягушек 1 вида, 3665 проб кровососущих комаров 33 видов (93 438 экземпляров), 570 проб иксодовых клещей 17 видов (4809 экземпляров). В **табл. 1** представлены объёмы птиц, мелких млекопитающих, комаров и иксодовых клещей по субъектам. В Волгоградской области также собрано 45 лягушек.

Видовой состав, объемы и результаты исследований представлены в **табл. 2** и **табл. 3**.

Маркеры возбудителя ЛЗН в полевом материале обнаружены в 7 субъектах из 3 федеральных округов (рисунок), в том числе в 3 субъектах (Кировская, Челябинская области и Республика Мордовия) доказательства течения эпизоотического процесса ЛЗН получены впервые. Из указанных территорий в Челябинской области в 2010 и 2011 гг. были зарегистрированы местные случаи заболева-

Таблица 1. Объёмы собранного в 2024 г. полевого материала

Субъект	Птицы (особей)	Мелкие млекопитающие (особей)	Комары		Иксодовые клещи	
			экземпляров	проб	экземпляров	проб
Астраханская область	–	–	7231	254	559	81
Волгоградская область	332	–	11 355	423	350	75
Ростовская область	–	–	3189	124	5	2
Республика Калмыкия	–	–	598	25	–	
Республика Адыгея	7	9	2926	112	370	67
Краснодарский край	1	–	9736	341	–	–
Челябинская область	–	–	2430	97	–	–
Оренбургская область	20	35	8855	312	230	23
Республика Башкортостан	5	30	4102	158	400	40
Пермский край	24	54	3034	142	779	70
Кировская область	–	75	7067	276	200	21
Республика Мордовия	44	60	5252	254	109	24
Удмуртская Республика	23	73	2995	120	222	20
Брянская область	166	–	2493	97	–	–
Смоленская область	4	35	5650	214	400	20
Орловская область	20	15	2736	117	310	33
Московская область	17	18	4054	168	57	8
Калужская область	21	16	3941	180	403	43
Рязанская область	0	35	5794	251	415	43
Итого	684	455	93 438	3665	4809	570

ния ЛЗН [14], однако за 2010–2023 гг. маркеры ВЗН в полевом материале не обнаружены.

РНК ВЗН выявлена в 6 (0,5%) из 1184 исследованных проб позвоночных животных и в 27 (0,6%) из 4235 проб членистоногих. В 1 пробе РНК типирована как 1-й генотип (Ростовская область), в 25 пробах — 2-й генотип (Ростовская, Волгоградская, Кировская, Челябинская, Астраханская области, Республика Мордовия, Краснодарский край), в 6 пробах — 4-й генотип (Волгоградская область).

Общий уровень индивидуальной заражённости (заражённость каждой особи) кровососущих комаров составил 0,03%, иксодовых клещей — 0,06%, птиц — 0,9%. При исследовании проб от мелких млекопитающих и лягушек маркеров ВЗН не обнаружено.

Из ЦФО с отрицательным результатом исследовано 228 птиц, 119 мелких млекопитающих, 1027 проб комаров, 147 проб иксодовых клещей.

Наибольшее количество проб от общего числа исследованных пришлось на Южный федеральный округ (ЮФО) и ПФО. Из ЮФО протестировано 340 птиц, 9 мелких млекопитающих, 45 лягушек, 1279 проб комаров, 225 проб иксодовых клещей. РНК ВЗН выявлена в 20 пробах комаров (индивидуальная заражённость составила 0,06%), 3 пробах иксодовых клещей (0,24%) и 6 пробах птиц (1,76%). Позвоночные из ПФО в исследованиях были представлены 116 птицами, 327 мелкими млекопитающими. Положительных находок от позвоночных не выявлено. Из 1262 проб комаров, собранных в этом округе, РНК ВЗН обнаружена в 3 (индивидуальная заражённость — 0,01%). Результаты исследований 198 проб иксодовых клещей — отрицательные.

Из УФО доставлены для исследований 97 проб комаров. РНК-маркеры ВЗН выявлены в 1 пробе. Уровень индивидуальной заражённости комаров составил 0,04%.

Обсуждение

Одним из ведущих факторов, обусловливающим активизацию эпизоотического процесса по ЛЗН, являются высокие показатели температуры воздуха. В 2024 г. на большей части территории России осреднённые аномалии были значительными в апреле, во все летние месяцы и в сентябре, что способствовало увеличению скорости репликации возбудителя, ускоренному прохождению всех стадий развития переносчиков и длительному пребыванию перелётных птиц на гнездовых ареалах.

При исследовании материала от птиц все пробы с положительным результатом выявлены только в Волгоградской области. Среди них есть осёдлые (серая ворона) и перелётные птицы (обыкновенный сверчок, большие бакланы, серые цапли). Павший

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-654

Таблица 2. Результаты исследований позвоночных на наличие РНК ВЗН в 2024 г.

Вид	Количество исследованных особей	Количество положительных особей
Птицы		
Белый аист — *Ciconia ciconia* Linnaeus, 1758	1	0
Серая куропатка — *Perdix perdix* Linnaeus, 1758	4	0
Обыкновенный фазан — *Phasianus colchicus* Linnaeus, 1758	5	0
Тетерев — *Lyrurus tetrix* Linnaeus, 1758	1	0
Сизый голубь — *Columba livia* Gmelin, 1789	84	0
Вяхирь — *Columba palumbus* Linnaeus, 1758	2	0
Пестрая утка — *Anas fulvigula* Ridgway, 1874	2	0
Серая утка — *Mareca strepera* Linnaeus, 1758	4	0
Хохлатая чернеть — *Aythya fuligula* Linnaeus, 1758	1	0
Белолобый гусь — *Anser albifrons* Scopoli, 1769	12	0
Серый гусь — *Anser anser* Linnaeus, 1758	6	0
Чирок-трескунок — *Spatula querquedula* Linnaeus, 1758	7	0
Чирок-свистунок — *Anas crecca* Linnaeus, 1758	12	0
Кряква — *Anas platyrhynchos* Linnaeus, 1758	157	0
Красноголовый нырок — *Aythya ferina* Linnaeus, 1758	3	0
Широконоска — *Spatula clypeata* Linnaeus, 1758	2	0
Свиязь — *Mareca penelope* Linnaeus, 1758	2	0
Большой крохаль — *Mergus merganser* Linnaeus, 1758	2	0
Огарь — *Tadorna ferruginea* Pallas, 1764	1	0
Обыкновенный гоголь — *Bucephala clangula* Linnaeus, 1758	3	0
Вальдшнеп — *Scolopax rusticola* Linnaeus, 1758	54	0
Бекас — *Gallinago gallinago* Linnaeus, 1758	1	0
Озерная чайка — *Chroicocephalus ridibundus* Linnaeus, 1766	9	0
Речная крачка — *Sterna hirundo* Linnaeus, 1758	1	0
Малая крачка — *Sternula albifrons* Pallas, 1764	2	0
Хохотунья — *Larus cachinnans* Pallas, 1811	1	0
Чибис — *Vanellus vanellus* Linnaeus, 1758	1	0
Хрустан — *Eudromias morinellus* Linnaeus, 1758	1	0
Перевозчик — *Actitis hypoleucos* Linnaeus, 1758	2	0
Коростель — *Crex crex* Linnaeus, 1758	1	0
Лысуха — *Fulica atra* Linnaeus, 1758	17	0
Серая цапля — *Ardea cinerea* Linnaeus, 1758	12	2
Обыкновенная кваква — *Nycticorax nycticorax* Linnaeus, 1758	2	0
Рыжая цапля — *Ardea purpurea* Linnaeus, 1766	4	0
Каравайка — *Plegadis falcinellus* Linnaeus, 1766	1	0
Большой баклан — *Phalacrocorax carbo* Linnaeus, 1758	43	2
Серая ворона — *Corvus cornix* Linnaeus, 1758	50	1
Ворон — *Corvus corax* Linnaeus, 1758	1	0
Грач — *Corvus frugilegus* Linnaeus, 1758	79	0
Обыкновенная сорока — *Pica pica* Linnaeus, 1758	22	0
Галка — *Coloeus monedula* Linnaeus, 1758	2	0
Сойка — *Garrulus glandarius* Linnaeus, 1758	6	0
Полевой воробей — *Passer montanus* Linnaeus, 1758	3	0
Домовый воробей — *Passer domesticus* Linnaeus, 1758	3	0
Большая синица — *Parus major* Linnaeus, 1758	7	0
Сорокопут-жулан — *Lanius collurio* Linnaeus, 1758	1	0

Окончание табл. 2

Вид	Количество исследованных особей	Количество положительных особей
Певчий дрозд — *Turdus philomelos* Brehm, 1831	2	0
Странствующий дрозд — *Turdus migratorius* Linnaeus, 1766	1	0
Черный дрозд — *Turdus merula* Linnaeus, 1758	2	0
Дрозд-рябинник — *Turdus pilaris* Linnaeus, 1758	7	0
Садовая славка — *Sylvia borin* Boddaert, 1783	1	0
Обыкновенная горихвостка — *Phoenicurus phoenicurus* Linnaeus, 1758	1	0
Обыкновенная зеленушка — *Chloris chloris* Linnaeus, 1758	1	0
Свиристель — *Bombycilla garrulus* Linnaeus, 1758	1	0
Деревенская ласточка — *Hirundo rustica* Linnaeus, 1758	1	0
Обыкновенная овсянка — *Emberiza citrinella* Linnaeus, 1758	1	0
Зарянка — *Erithacus rubecula* Linnaeus, 1758	5	0
Зяблик — *Fringilla coelebs* Linnaeus, 1758	1	0
Садовая камышовка — *Acrocephalus dumetorum* Blyth, 1849	2	0
Пеночка-таловка — *Phylloscopus borealis* Blasius, 1858	2	0
Крапивник — *Troglodytes troglodytes* Linnaeus, 1758	1	0
Обыкновенный сверчок — *Locustella naevia* Boddaert, 1783	1	1
Серая мухоловка — *Muscicapa striata* Pallas, 1764	1	0
Ястребиная славка — *Curruca nisoria* Bechstein, 1795	1	0
Чёрный стриж — *Apus apus* Linnaeus, 1758	2	0
Желна — *Dryocopus martius* Linnaeus, 1758	1	0
Большой пёстрый дятел — *Dendrocopos major* Linnaeus, 1758	2	0
Обыкновенный козодой — *Caprimulgus europaeus* Linnaeus, 1758	1	0
Длиннохвостая неясыть — *Strix uralensis* Pallas, 1771	1	0
Серая неясыть — *Strix aluco* Linnaeus, 1758	4	0
Кобчик — *Falco vespertinus* Linnaeus, 1766	1	0
Болотный лунь — *Circus aeruginosus* Linnaeus, 1758	1	0
Чёрный коршун — *Milvus migrans* Boddaert, 1783	1	0
Обыкновенный канюк — *Buteo buteo* Linnaeus, 1758	1	0
Итого	684	6
Мелкие млекопитающие		
Рыжая полёвка — *Myodes glareolusu* Schreber, 1780	186	0
Кустарниковая полёвка — *Microtus majori* Satunin, 1907	1	0
Обыкновенная полёвка — *Microtus arvalis* Pallas, 1779	40	0
Серая полёвка *Microtus* Schrank, 1798, sp.	7	0
Водяная полёвка — *Arvicola amphibius* Linnaeus, 1758	1	0
Домовая мышь — *Mus musculus* Linnaeus, 1758	8	0
Желтогорлая мышь — *Apodemus flavicollis* Melchior, 1834	9	0
Малая лесная мышь — *Sylvaemus uralensis* Pallas, 1811	134	0
Полевая мышь — *Apodemus agrarius* Pallas, 1771	35	0
Пашенная полёвка — *Microtus agrestis* Linnaeus, 1761	1	0
Серая крыса — *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769	5	0
Европейский крот — *Talpa europaea* Linnaeus, 1758	1	0
Обыкновенная бурозубка — *Sorex araneus* Linnaeus, 1758	27	0
Итого	455	0
Земноводные		
Озёрная лягушка — *Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771	45	0

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-654

Таблица 3. Результаты исследований членистоногих на наличие РНК ВЗН в 2024 г.

Вид	Количество экземпляров	Количество исследованных проб	Количество положительных проб
Кровососущие комары			
Anopheles algeriensis Theobald, 1903	172	7	0
Anopheles claviger Meigen, 1804	695	36	0
Anopheles hyrcanus Pallas, 1771	4096	146	0
к. Anopheles maculipennis Meigen, 1818	38 292	1577	2
Anopheles plumbeus Stephens, 1828	8	2	0
Aedes albopictus Skuse, 1895	30	1	0
Aedes annulipes Meigen, 1830	111	6	0
Aedes behningi Martini, 1926	201	11	0
Aedes cantans Meigen, 1818	4687	164	0
Aedes caspius Pallas, 1771	2865	109	0
Aedes cataphylla Dyar, 1916	204	8	0
Aedes cinereus Meigen, 1818	2066	80	1
Aedes communis De Geer, 1776	964	36	0
Aedes cyprius Ludlow, 1920	5	1	0
Aedes dorsalis Meigen, 1830	878	34	0
Aedes excrucians Walker, 1856	709	25	0
Aedes flavescens Muller, 1764	1014	52	0
Aedes geniculatus Olivier, 1791	214	11	0
Aedes intrudens Dyar, 1919	380	14	0
Aedes nigrinus Eckstein, 1918	15	1	0
Aedes pulcritarsis Rondani, 1872	83	4	0
Aedes punctor Kirby, 1837	132	5	0
Aedes riparius Dyar et Knab, 1907	63	3	0
Aedes sticticus Meigen, 1838	3974	143	0
Aedes subdiversus Martini, 1926	1	1	0
Aedes vexans Meigen, 1830	8344	293	0
Culex modestus Ficalbi, 1890	5197	188	2
Culex pipiens Linnaeus, 1758	13 428	477	11
Culiseta alaskaensis Ludlow, 1906	322	24	0
Culiseta annulata Schrank, 1776	480	46	0
Culiseta longiareolata Macquart, 1838	59	6	0
Coquillettidia richiardii Ficalbi, 1889	3573	146	2
Uranotaenia unguiculata Edwards, 1913	176	8	6
Итого	93 438	3665	24
Иксодовые клещи			
Dermacentor marginatus Sulzer, 1776	96	13	0
Dermacentor niveus Neumann, 1897	33	3	0
Dermacentor reticulatus Fabricius, 1794	1688	193	0
Haemaphysalis punctata Canestrini and Fanzago, 1878	9	1	0
Hyalomma detritum Schulze, 1919	20	1	0
Hyalomma marginatum Koch, 1844	197	50	2
Hyalomma scupense Schulze, 1919	181	39	0
Ixodes persulcatus Schulze, 1930	960	86	0

Окончание табл. 3

Вид	Количество экземпляров	Количество исследованных проб	Количество положительных проб
Ixodes ricinus Linnaeus, 1758	895	77	0
Rhipicephalus annulatus Say, 1821	342	64	0
Rhipicephalus niveus Yamazaki (1919)	15	2	0
Rhipicephalus rossicus Yakimov et Kohl-Yakimova, 1911	169	18	1
Rhipicephalus sanguineus Latreille, 1806	66	9	0
Rhipicephalus turanicus Pomerantsev 1936	20	2	0
Rhipicephalus pumilio Schulze, 1935	118	12	0
Итого	4809	570	3

обыкновенный сверчок обнаружен нами в районе многоэтажной застройки в центре Волгограда в середине августа в период максимальной активности возбудителя и комаров рода *Culex*. Вместе с тем за многолетний период изучения ЛЗН на юге России официально эпизоотии среди птиц с летальными исходами (Волгоградская и Астраханская области) не регистрировались. Данный факт объяснялся возможной адаптацией популяций местных птиц в результате взаимодействия в течение длительного времени с популяцией возбудителя [15]. Подтверждение этиологической роли возбудителя ЛЗН в возникновении заболевания с летальным исходом у птицы на территории «старого» очага болезни в сезон 2024 г. позволяет предположить, что здесь не осуществляются активный мониторинг за заболеваемостью диких и синантропных птиц, а также прицельное обследование на наличие маркеров ВЗН павших особей в соответствии с нормативным документом[2].

Остальные птицы с выявленной РНК ВЗН добыты на рыбоводных прудах и озёрах Волго-Ахтубинской поймы в Волгоградской области с 28 сентября по 3 ноября. Большие бакланы и серые цапли используют данные биотопы в качестве остановок для отдыха и кормёжки в период осенней миграции к местам зимовок, а осёдлые серые вороны тяготеют к этим водоёмам из-за постоянного наличия на их берегах остатков пищи от других птиц.

Маркеры ВЗН на территории России за весь период наблюдений обнаружены в комарах 19 видов [16–18]. По результатам наших исследований, в 2024 г. положительными на наличие РНК ВЗН были комары 6 видов. В структуре положительных находок на долю *C. pipiens* приходится 45,8%, *U. unguiculata* — 25,0%, *C. richiardii*, *Cx. modestus* и комаров *An. maculipennis* — по 8,3%, *Ae. cinereus* — 4,2%.

Уровень индивидуальной инфицированности комаров, питающихся на птицах и млекопитающих, в том числе на людях, составил у *C. pipiens* — 0,08%, *C. richiardii* — 0,06%, *Cx. modestus* и *Ae. cinereus* — по 0,04%, *An. maculipennis* — 0,006%. Этот показатель у комаров *U. unguiculata*, основными прокормителями которых являются лягушки — носители ВЗН 4-го генотипа, достигал 6,3%. Патогенность ВЗН 4-го генотипа для человека на сегодняшний день не доказана.

Все комары *C. pipiens*, *An. maculipennis* и *C. richiardii,* в которых выявлены маркеры ВЗН, собраны в населённых пунктах. Комары *Ae. cinereus* и *Cx. modestus* отловлены на берегах водоёмов в местах концентрации водоплавающих птиц. Это свидетельствует о высоком риске заражения населения ВЗН как в урбанизированных, так и в природных биотопах.

Территориально, как и ожидалось, максимальное количество (20) положительных находок от комаров выявлено в ЮФО: 8 — в Астраханской области, 10 — в Волгоградской, по 1 — в Ростовской области и Краснодарском крае. В ПФО в комарах маркеры ВЗН обнаружены: в 2 пробах из Республики Мордовия и 1 — из Кировской области. Из 97 проб, собранных на юге УФО в Челябинской области, возбудитель обнаружен в 1 пробе от теплолюбивых комаров *Cx. modestus*, которые достигают высокой численности только в ЮФО. В центральной же России они встречаются, как правило, в незначительном количестве и не во всех субъектах. И хотя среднелетние показатели температуры Южного Урала на 2,0–3,5°C ниже, чем в целом по ЦФО, обитание на данной территории одного из основных переносчиков ВЗН в Европе и выявление от него РНК возбудителя указывает на достаточно высокий риск заражения населения в Челябинской области.

В остальных обследованных субъектах заражённые ВЗН переносчики не обнаружены, что не исключает наличие здесь очагов ЛЗН и требует проведения повторных исследований с выбором иных биотопов для сбора полевого материала.

[2] Пп. 5.18, 5.5, 8.5.1 Эпидемиологический надзор, лабораторная диагностика и профилактика лихорадки Западного Нила. МУ 3.1/4.2.4063-24. М.; 2024. 46 с.

DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-654

Положительные на наличие РНК ВЗН пробы от иксодовых клещей выявлены только в ЮФО: 2 — от *H. marginatum* из Волгоградской области и 1 — от *Rhipicephalus rossicus* из Ростовской области. Их уровень индивидуальной инфицированности составил 1,0 и 1,8% соответственно.

Выявление РНК ВЗН в середине апреля от клещей и в июне от комаров и клещей указывает на раннюю активизацию эпизоотического процесса в 2024 г. Кроме того, апрельские находки также могут свидетельствовать о сохранении ВЗН в клещах в зимний период.

Представляет научный интерес установленная нами сочетанная циркуляция ВЗН 1-го и 2-го генотипов в Ростовской области.

Выводы

На юге России энзоотичная циркуляция ВЗН в 2024 г. подтверждена на территории Волгоградской, Астраханской, Ростовской областей и Краснодарского края. Начало активизации эпизоотического процесса ЛЗН зарегистрировано на данных территориях (за исключением Астраханской области) в весенний–раннелетний период, что являлось предвестником возможного эпидемиологического неблагополучия. Обнаружение положительных находок в Республике Мордовия, Кировской и Челябинской областях подтверждает циркуляцию ВЗН на территориях ПФО и УФО. Информация по области распространения ВЗН в России дополнена данными по 3 новым субъектам, а самой северной точкой выявления РНК возбудителя в полевом материале в нашем исследовании была Кировская область.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Топорков А.В., ред. *Лихорадка Западного Нила.* Волгоград; 2017. Toporkov A.V., ed. *West Nile Virus.* Volgograd;2017.
2. Захаров К.С., Магеррамов Ш.В., Матросов А.Н. Экологические аспекты районирования территории Саратовской области по уровню риска формирования очагов лихорадки Западного Нила. *Поволжский экологический журнал.* 2021;(1):3–15. Zakharov K.S., Magerramov Sh.V., Matrosov A.N. Ecological aspects of zoning the territory of the Saratov region by the risk level of formation of West Nile fever foci. *Povolzhskiy Journal of Ecology.* 2021;(1):3–15. DOI: https://doi.org/10.35885/1684-7318-2021-1-3-15 EDN: https://elibrary.ru/pafkqi
3. Frasca F., Sorrentino L., Fracella M., et al. An update on the entomology, virology, pathogenesis, and epidemiology status of West Nile and Dengue viruses in Europe (2018–2023). *Trop. Med. Infect. Dis.* 2024;9(7):166. DOI: https://doi.org/10.3390/tropicalmed9070166
4. Львов Д.К., ред. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. М.;2013. L'vov D.K., ed. *Viruses and Viral Infections of Humans and Animals.* Moscow;2013.
5. Якименко В.В., Малькова М.Г., Тюлько Ж.С. и др. *Трансмиссивные вирусные инфекции Западной Сибири (региональные аспекты эпидемиологии, экологии возбудителей и вопросы микроэволюции).* Омск;2019. Yakimenko V.V., Malkova M.G., Tyulko J.S., et al. *Transmissible Viral Infections of Western Siberia (Regional Aspects of Epidemiology, Ecology of Pathogens and Issues of Microevolution).* Omsk;2019.
6. Трифонов В.А., Бойко В.А., Потапов В.С. и др. Основные эпидемиологические закономерности заболеваемости некоторыми природно-очаговыми инфекциями в Республике Татарстан. *Дезинфекционное дело.* 2009;(3):39–42. Trifonov V.A., Boyko V.A., Potapov V.S., et al. Basic epidemiological patterns of incidence of some natural focal infections in the Republic of Tatarstan. *Disinfection Affairs.* 2009;(3):39–42. EDN: https://elibrary.ru/kwhowj
7. Сычева К.А., Федорова М.В., Макенов М.Т. и др. Переносчики и резервуарные хозяева возбудителя лихорадки Западного Нила во время вспышки заболевания в Москве. В кн.: *Материалы XIV Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского. Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы*. М.;2022. Sycheva K.A., Fedorova M.V., Makenov M.T., et al. Vectors and reservoir hosts of the West Nile fever pathogen during the disease outbreak in Moscow. In: *Proceedings of the XIV Annual All-Russian Congress on Infectious Diseases named after Academician V.I. Pokrovsky. Infectious Diseases in the Modern World: Evolution, Current and Future Threats*. Moscow;2022. EDN: https://elibrary.ru/lguirc
8. Львов Д.К., Альховский С.В., Жирнов О.П. 130 лет вирусологии. *Вопросы вирусологии.* 2022;67(5):357–84. L'vov D.K., Alkhovsky S.V., Zhirnov O.P. 130th anniversary of virology. *Problems of Virology.* 2022;67(5):357–84. DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-140 EDN: https://elibrary.ru/qhembl
9. Горностаева Р.М. *Комары Москвы и Московской области.* М.;1999. Gornostaeva R.M. *Mosquitoes of Moscow and the Moscow Region.* Moscow;1999.
10. Гуцевич А.В., Мончадский А.С., Штакельберг А.А. *Фауна СССР. Насекомые двукрылые. Комары. Семейство Culicidae. Том 3.* Ленинград;1970. Gutsevich A.V., Monchadsky A.S., Shtakelberg A.A. Fauna of the USSR. *Diptera Insects. Mosquitoes. The Family Culicidae. Volume 3.* Leningrad;1970.
11. Филиппова Н.А. *Иксодовые клещи подсем. Ixodinae. Фауна СССР. Паукообразные. Том 4.* М.;1977. Filippova N.A. *Ixodic Ticks of the Subfamily. Ixodinae. Fauna of the USSR. Arachnids. Volume 4.* Moscow;1977.
12. Федорова М.В., Сычева К.А. *Кровососущие комары (Diptera:Culicidae) Краснодарского края и полуострова Крым: определитель.* М.;2024. Fedorova M.V., Sycheva K.A. *Bloodsucking Mosquitoes (Diptera:Culicidae) of the Krasnodar Territory and the Crimean Peninsula: Identification Guide.* Moscow;2024.
13. Беклемишев В.Н. К изучению зараженности клещей – переносчиков энцефалита методом биопробы. *Вопросы вирусологии.* 1963;8(2):240–2. Beklemishev V.N. On the study of infection of ticks – carriers of encephalitis by the bioprobe method. *Problems of Virology.* 1963;8(2):240–2.
14. Антонов В.А., Смоленский В.Ю., Путинцева Е.В. и др. Эпидемиологическая ситуация по лихорадке Западного Нила в 2011 году на территории Российской Федерации и прогноз ее развития. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2012;(1):17–21. Antonov V.A., Smolensky V.Yu., Putintseva E.V., et al. West Nile fever epidemic situation in the Russian Federation territory in 2011 and prognosis of its development. *Problems of Particularly Dangerous Infections.* 2012;(1):17–21. DOI: https://doi.org/10.21055/0370-1069-2012-1(111)-17-21 EDN: https://elibrary.ru/origtz
15. Львов Д.К., Савченко С.Т., Алексеев В.В. и др. Эпидемиологическая ситуация и прогноз заболеваемости лихорадкой Западного Нила на территории Российской Федерации. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2008;(1):10–2. L'vov D.K., Savchenko S.T., Alekseev V.V. et al. Epidemiological situation

and prognostication of the West Nile fever morbidity in the territory of the Russian Federation. *Problems of Particularly Dangerous Infections.* 2008;(1):10–2.
DOI: https://doi.org/10.21055/0370-1069-2008-1(95)-10-12
EDN: https://elibrary.ru/iqfwsf

16. Федорова М.В., Бородай Н.В. О необходимости и путях совершенствования энтомологического мониторинга при эпидемиологическом надзоре за лихорадкой Западного Нила. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни.* 2017;(2):37–42. Fedorova M.V., Borodai N.V. On the necessity and ways to improve entomological monitoring in the epidemiological surveillance of West Nile fever. *Medical parasitology and parasitic diseases.* 2017;(2):37–42.
EDN: https://elibrary.ru/ysticd
17. Квасов Д.А., Бородай Н.В., Гайдукова Е.П. и др. Результаты мониторинга за Лихорадкой Западного Нила в Воронежской области. В сб.: *Состояние и проблемы экосистем Среднерусской лесостепи. Труды биологического центра ВГУ «Веневитиново», Том 34.* Воронеж;2022:37–44. Kvasov D.A., Borodai N.V., Gaidukova E.P., et al. Monitoring results for West Nile fever in the Voronezh region. In: *The State and Problems of Ecosystems of the Central Russian Forest Steppe. Proceedings of the Biological Center of VSU «Venevitinovo», Volume 34.* Voronezh;2022:37–44.
EDN: https://elibrary.ru/ocvpck
18. Алексейчик И.О., Путинцева Е.В., Смелянский В.П. и др. Особенности эпидемической ситуации по лихорадке Западного Нила на территории Российской Федерации в 2018 г. и прогноз ее развития на 2019 г. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2019;(1):17–25. Alekseichik I.O., Putintseva E.V., Smelyansky V.P., et al. Peculiarities of the epidemic situation on West Nile fever in the territory of the Russian Federation in 2018 and forecast of its development in 2019. *Problems of Particularly Dangerous Infections.* 2019;(1):17–25.
DOI: https://doi.org/10.21055/0370-1069-2019-1-17-25
EDN: https://elibrary.ru/cgbjja

Информация об авторах

Бородай Наталья Владимировна✉ — н. с. лаб. эпидемиологического анализа и эпизоотологического мониторинга Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора, Волгоград, Россия, borodai.nat@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0002-2076-5276

Несговорова Анна Владимировна — н. с. лаб. эпидемиологического анализа и эпизоотологического мониторинга Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора, Волгоград, Россия, info@vnipchi.rospotrebnadzor.ru, https://orcid.org/0000-0001-5810-8864

Мендыгалиева Айна Кеннжевоевна — н. с. лаб. эпидемиологического анализа и эпизоотологического мониторинга Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора, Волгоград, Россия, info@vnipchi.rospotrebnadzor.ru, https://orcid.org/0000-0002-3862-9133

Колоскова Анна Юрьевна — н. с. лаб. эпидемиологического анализа и эпизоотологического мониторинга Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора, Волгоград, Россия, info@vnipchi.rospotrebnadzor.ru, https://orcid.org/0009-0008-4086-0327

Удовиченко Светлана Константиновна — канд. мед. наук, в. н. с. лаб. эпидемиологического анализа и эпизоотологического мониторинга Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора, Волгоград, Россия, info@vnipchi.rospotrebnadzor.ru, https://orcid.org/0000-0001-8682-1536

Зарубин Николай Андреевич — м. н. с. лаб. эпидемиологического анализа и эпизоотологического мониторинга Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора, Волгоград, Россия, info@vnipchi.rospotrebnadzor.ru, https://orcid.org/0000-0001-7689-3421

Каргашин Станислав Александрович — м. н. с. лаб. эпидемиологического анализа и эпизоотологического мониторинга Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора, Волгоград, Россия, info@vnipchi.rospotrebnadzor.ru, https://orcid.org/0000-0002-2498-9947

Гусев Евгений Александрович — н. с. лаб. арбовирусных инфекций Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора, Волгоград, Россия, info@vnipchi.rospotrebnadzor.ru, https://orcid.org/0000-0002-9143-7907

Батурин Артем Александрович — канд. биол. наук, с. н. с. лаб. генодиагностики особо опасных инфекций Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора, Волгоград, Россия, info@vnipchi.rospotrebnadzor.ru, https://orcid.org/0000-0001-9510-7246

Information about the authors

Natalia V. Borodai✉ — researcher, Laboratory of epidemiological analysis and epizootological monitoring, Volgograd Plague Control Researsh Institute, Volgograd, Russia, borodai.nat@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0002-2076-5276

Anna V. Nesgovorova — researcher, Laboratory of epidemiological analysis and epizootological monitoring, Volgograd Plague Control Researsh Institute, Volgograd, Russia, info@vnipchi.rospotrebnadzor.ru, https://orcid.org/0000-0001-5810-8864

Aina K. Mendygalieva — researcher, Laboratory of epidemiological analysis and epizootological monitoring, Volgograd Plague Control Researsh Institute, Volgograd, Russia, info@vnipchi.rospotrebnadzor.ru, https://orcid.org/0000-0002-3862-9133

Anna Yu. Koloskova — researcher, Laboratory of epidemiological analysis and epizootological monitoring, Volgograd Plague Control Researsh Institute, Volgograd, Russia, info@vnipchi.rospotrebnadzor.ru, https://orcid.org/0009-0008-4086-0327

Svetlana K. Udovichenko — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of epidemiological analysis and epizootological monitoring, Volgograd Plague Control Researsh Institute, Volgograd, Russia, info@vnipchi.rospotrebnadzor.ru, https://orcid.org/0000-0001-8682-1536

Nikolay A. Zarubin — junior researcher, Laboratory of epidemiological analysis and epizootological monitoring, Volgograd Plague Control Researsh Institute, Volgograd, Russia, info@vnipchi.rospotrebnadzor.ru, https://orcid.org/0000-0001-7689-3421

Stanislav A. Kargashin — junior researcher, Laboratory of epidemiological analysis and epizootological monitoring, Volgograd Plague Control Researsh Institute, Volgograd, Russia, info@vnipchi.rospotrebnadzor.ru, https://orcid.org/0000-0002-2498-9947

Yevgeny A. Gusev — researcher, Laboratory of arboviral infections, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russia, info@vnipchi.rospotrebnadzor.ru, https://orcid.org/0000-0002-9143-7907

Artem A. Baturin — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of gene diagnostics of particularly dangerous infections, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russia, info@vnipchi.rospotrebnadzor.ru, https://orcid.org/0000-0001-9510-7246

Irina A. Khabarova — researcher, Laboratory of experimental biomodels, Volgograd Plague Control Researsh Institute, Volgograd, Russia, info@vnipchi.rospotrebnadzor.ru, https://orcid.org/0000-0003-1767-7790

DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-654

Хабарова Ирина Андреевна — н. с. лаб. экспериментальных биомоделей Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора, Волгоград, Россия,
info@vnipchi.rospotrebnadzor.ru,
https://orcid.org/0000-0003-1767-7790

Путинцева Елена Викторовна — канд. мед. наук, в. н. с. лаб. эпидемиологического анализа и эпизоотологического мониторинга Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора, Волгоград, Россия,
info@vnipchi.rospotrebnadzor.ru,
https://orcid.org/0000-0002-9368-6165

Топорков Андрей Владимирович — д-р мед. наук, доцент, директор Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора, Волгоград, Россия,
info@vnipchi.rospotrebnadzor.ru,
https://orcid.org/0000-0002-3449-4657

Участие авторов: *Бородай Н.В.* — концепция исследования, сбор и подготовка полевого материала, анализ данных, написание текста; *Несговорова А.В.* — дизайн исследования, сбор и подготовка полевого материала, написание текста; *Мендыгалиева А.К.* — сбор и подготовка полевого материала, анализ данных, написание текста; *Колоскова А.Ю.* — сбор и подготовка полевого материала, написание текста; *Удовиченко С.К.* — написание и редактирование текста; *Зарубин Н.А., Каргашин С.А.* — сбор полевого материала; *Гусев Е.А., Хабарова И.А.* — пробоподготовка; *Батурин А.А.* — молекулярно-генетические исследования; *Путинцева Е.В.* — редактирование текста; *Топорков А.В.* — общее руководство проектом. 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 17.04.2025;
принята к публикации 24.06.2025;
опубликована 28.08.2025

Elena V. Putintseva — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of epidemiological analysis and epizootological monitoring, Volgograd Plague Control Researsh Institute, Volgograd, Russia,
info@vnipchi.rospotrebnadzor.ru,
https://orcid.org/0000-0002-9368-6165

Andrey V. Toporkov — Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Director, Volgograd Plague Control Researsh Institute, Volgograd, Russia,
info@vnipchi.rospotrebnadzor.ru,
https://orcid.org/0000-0002-3449-4657

Author contribution: *Borodai N.V.* — concept of the study, collection and preparation of field material, data analysis, writing the text; *Nesgovorova A.V.* — design of the study, data analysis, writing the text; *Mendygalieva A.K.* — collection and preparation of field material, data analysis, writing the text; *Koloskova A.Yu.* — collection and preparation of field material, writing the text; *Udovichenko S.K.* — writing and editing the text; *Zarubin N.A., Kargashin S.A.* — collection of field material; *Gusev Yu.A., Khabarova I.A.* — sample preparation; *Baturin A.A.* — conducting molecular genetic research; *Putintseva E.V.* — editing the text; *Toporkov A.V.* — general supervision. 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 17.04.2025;
accepted for publication 24.06.2025;
published 28.08.2025

Оригинальное исследование
https://doi.org/10.36233/0372-9311-616

Анализ генетических вариантов и лекарственной устойчивости ВИЧ-1 среди мужчин с рискованным сексуальным поведением, граждан Кубы, проживающих в Москве в 2022–2024 годах

Лаповок И.А.[1]✉, Кириченко А.А.[1], Шлыкова А.В.[1], Киреев Д.Е.[1], Попова А.А.[1, 2], Покровская А.В.[1, 3]

[1]Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;
[2]Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия;
[3]Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Москва, Россия

Аннотация

Введение. Эпидемия ВИЧ-инфекции на Кубе имеет свои особенности по сравнению с эпидемией в России. Миграционные потоки между Кубой и Россией способны оказать влияние на генетическое разнообразие и лекарственную устойчивость ВИЧ-1 в России. Отдельного внимания заслуживает уязвимая группа мужчин с рискованным сексуальным поведением, в частности — мужчины, практикующие секс с мужчинами (МСМ), и работники коммерческого секса.

Целью нашего исследования был анализ генетических вариантов ВИЧ-1 и лекарственной устойчивости ВИЧ-1 в образцах плазмы крови, полученных от мигрантов — МСМ с Кубы, проживающих в Москве.

Материалы и методы. Была собрана коллекция образцов плазмы крови, сопутствующая эпидемиологическая и клиническая информация от пациентов — МСМ с Кубы, получены нуклеотидные последовательности генома ВИЧ-1. Были проведены генотипический, кластерный анализ и анализ лекарственной устойчивости (ЛУ) ВИЧ-1.

Результаты. Были проанализированы образцы и эпидданные, полученные от 27 пациентов в 2022–2024 гг. Было выявлено, что 24/27 пациентов (включая 12/15, предполагающих факт инфицирования в Москве, и 10, предполагающих инфицирование на Кубе), были инфицированы вариантами ВИЧ-1, типичными для Кубы, а не для России. Это говорит об инфицировании 88,89% пациентов их согражданином. ЛУ была выявлена у 9 (33,33%; 95% ДИ 15,55–51,11) пациентов. Наиболее часто отмечалась устойчивость к эфавирензу и невирапину, что было связано с мутациями *K103N*, *Y181C* и *P225H* гена обратной транскриптазы.

Заключение. Фактор миграции должен учитываться в программах профилактики и противодействия распространению ВИЧ-инфекции в России, а генетические особенности ВИЧ-1 необходимо принимать во внимание при подборе эффективной терапии у мигрантов.

Ключевые слова: *ВИЧ-1, МСМ, мигранты, вирусный вариант, CRF, BG-рекомбинанты, лекарственная устойчивость, кластер*

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ЦНИИ Эпидемиологии (протокол № 142 от 25.04.2024).

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

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

Для цитирования: Лаповок И.А., Кириченко А.А., Шлыкова А.В., Киреев Д.Е., Попова А.А., Покровская А.В. Анализ генетических вариантов и лекарственной устойчивости ВИЧ-1 среди мужчин с рискованным сексуальным поведением, граждан Кубы, проживающих в Москве в 2022–2024 годах. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2025;102(4):425–435.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-616
EDN: https://www.elibrary.ru/zoyqjd

© Лаповок И.А., Кириченко А.А., Шлыкова А.В., Киреев Д.Е., Попова А.А., Покровская А.В., 2025

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-616
ORIGINAL RESEARCHES

Original Study Article
https://doi.org/10.36233/0372-9311-616

Analysis of HIV-1 genetic variants and drug resistance among men with high-risk sexual behavior, Cuban citizens, living in Moscow in 2022–2024

Ilya A. Lapovok[1]✉, Alina A. Kirichenko[1], Anastasia V. Shlykova[1], Dmitry E. Kireev[1], Anna A. Popova[1, 2], Anastasia V. Pokrovskaya[1, 3]

[1]Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia;
[2]Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia;
[3]Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. The characteristics of the HIV epidemic in Cuba are comparable to those of the HIV epidemic in Russia. Migration between Cuba and Russia can affect HIV-1 genetic diversity and drug resistance in Russia. The vulnerable group of men with risk sexual behavior including men who have sex with men (MSM) and commercial sex workers (CSW) deserves special attention. The **aim** of our study was the analysis of HIV-1 genetic variants and HIV-1 drug resistance in blood plasma samples obtained from MSM migrants from Cuba living in Moscow.

Materials and methods. A collection of blood plasma samples, epidemiological and clinical information was collected from MSM patients — migrants from Cuba, nucleotide sequences of the HIV-1 genome were obtained. HIV-1 genotyping, cluster analysis and analysis of drug resistance (DR) were carried out.

Results. Samples and epidemiological data obtained in 2022–2024 from 27 patients were analyzed. 24/27 patients (including 12/15 suspected of infection in Moscow and all 10 — in Cuba) harbored HIV-1 variants typical for Cuba, not Russia. This indicates that 88.89% of patients were infected by their fellow citizen. DR was detected in 9 patients (33.33%; 95% CI 15.55–51.11). The most common resistance was DR to efavirenz (EFV) and nevirapine (NVP), which was associated with *K103N, Y181C* and *P225H* mutations.

Conclusion. The migration factor should be taken into account in HIV-1 prevention and control of HIV-spreading programs in Russia, and the genetic characteristics of HIV-1 in migrants should be taken into account in effective therapy selecting.

Keywords: *HIV-1, MSM, migrants, viral variant, CRF, BG-recombinants, drug resistance, cluster*

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Central Research Institute of Epidemiology (protocol No. 142, April 25, 2024).

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

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

For citation: Lapovok I.A., Kirichenko A.A., Shlykova A.V., Kireev D.E., Popova A.A., Pokrovskaya A.V. Analysis of HIV-1 genetic variants and drug resistance among men with high-risk sexual behavior, Cuban citizens, living in Moscow in 2022–2024. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2025;102(4):425–435.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-616
EDN: https://www.elibrary.ru/zoyqjd

Введение

Связи между Кубой и Россией в последние годы значительно укрепились. В основе сотрудничества между государствами лежат Декларация о принципах взаимоотношений между Российской Федерацией и Республикой Куба[1], Меморандум о принципах стратегического сотрудничества[2] и Совместное заявление президентов двух стран[3], принятые в 1996, 2009 и 2018 гг. соответственно.

Тесные связи между Россией и Кубой приводят к усилению миграционных процессов между странами. Поскольку в России и на Кубе существует проблема распространения ВИЧ-инфекции, то всегда есть опасность заноса на территорию одной страны вариантов ВИЧ-1, циркулирующих на тер-

[1] Декларация о принципах взаимоотношений между Российской Федерацией и Республикой Куба. 1996. URL: https://docs.cntd.ru/document/1902532?section=text

[2] Меморандум о принципах стратегического сотрудничества между Российской Федерацией и Республикой Куба. 2009. URL: https://docs.cntd.ru/document/902161646?section=text

[3] Совместное заявление Президента Российской Федерации В.В. Путина и Председателя Государственного Совета и Совета Министров Республики Куба М. Диас-Канеля Бермудеса об общих подходах в международных делах. 2018. URL: http://www.kremlin.ru/supplement/5354

© Lapovok I.A., Kirichenko A.A., Shlykova A.V., Kireev D.E., Popova A.A., Pokrovskaya A.V., 2025

ритории другой страны. Затем распространение этих вариантов в пределах отдельных уязвимых групп может привести к увеличению случаев инфекции данными вариантами, что способно повлиять на генетический ландшафт ВИЧ-инфекции и профиль лекарственной устойчивости (ЛУ) в стране. Одной из таких уязвимых групп являются мужчины с рискованным сексуальным поведением, в частности мужчины, практикующие секс с мужчинами (МСМ), и работники коммерческого секса (КСР). Для представителей данной группы типичны половые контакты с гражданами других стран, что способно повлиять на генетическое разнообразие ВИЧ-1 и привести к генерации новых рекомбинантных форм вируса.

На Кубе в последние годы отмечен рост числа случаев ВИЧ-инфекции. По данным Объединённой программы Организации Объединённых Наций по ВИЧ/СПИДу (ЮНЭЙДС), общее число людей, живущих с ВИЧ-1 на Кубе, продолжало расти в последнее десятилетие, увеличившись с 3100 в 2000 г. до 14 000 в 2011 г. [1] и до 44 000 в 2023 г.[4] Между тем в последние годы Куба демонстрирует успех в диагностике и лечении ВИЧ-инфекции. В общей сложности 33 000 (75%) человек в 2023 г. знали о своём ВИЧ-статусе. Из них 28 000 (84,84%) находились на антиретровирусной терапии (АРТ). Наконец, 24 000 (85,72%) пациентов, получавших АРТ, имели вирусологический успех. Таким образом, Куба уверенно приближается к выполнению стратегии Всемирной организации здравоохранения по противодействию ВИЧ-инфекции 90–90–90 и имеет перспективы достигнуть основных показателей стратегии 95–95–95 к 2030 г. [2].

Генетическое разнообразие ВИЧ-1 на Кубе сильно отличается от такового на территории стран Карибского бассейна. В то время как на территории большинства государств этого региона доминирует вирус субтипа B, связанный с более чем 90% случаев инфекции в начале 2000-х гг., на Кубе активно циркулирует большое количество других генетических вариантов ВИЧ-1, включая рекомбинантные формы, распространённые исключительно на острове [3]. Так, если ещё в середине 1990-х гг. доминирующим вирусным вариантом на Кубе был субтип B [4], то исследование 2002 г. показало, что лишь 48% пациентов были инфицированы этим генетическим вариантом [5]. В 2017 г. доля субтипа B в образцах от пациентов старше 18 лет, собранных за 1-е полугодие 2017 г., составила лишь 26,9%, а на инфекцию различными рекомбинантными формами приходилось 59,5% случаев ВИЧ-инфекции [6].

Касательно субтипа B, распространённого на Кубе, следует упомянуть, что этот вариант генетически близок к вирусу, доминирующему в США и большинстве стран Западной Европы, но отличается от вирусов, распространённых в других странах Карибского бассейна [1, 7, 8]. Одни исследователи связывают это с многократным несвязанным заносом субтипа B из США, Канады и европейского континента в конце 1970-х гг. [7]. Другие предполагают, что он попал на Кубу в начале 1990-х гг. из США, когда на фоне экономического кризиса, вызванного разрушением СССР, стал развиваться туристический бизнес на Кубе, а миграционные потоки переключились на США [1].

Помимо субтипа B, на Кубе циркулирует рекомбинантная форма CRF19_cpx, чей геном представлен фрагментами генома ВИЧ-1 субтипов D, A1 и G [3, 9]. Впервые CRF19_cpx был описан на Кубе в 1999 г. [10]. Детальный анализ позволил установить, что CRF19_cpx является рекомбинантом двух вирусных вариантов: AG-рекомбинанта из Камеруна, позже описанного как рекомбинант CRF37_cpx, и вируса субтипа D из Габона [9–11]. По-видимому, CRF19_cpx появился в кубинской общине на территории Демократической Республики Конго (ДРК) в 1966–1970 гг., откуда попал в провинцию Вилья-Клара (Куба) в конце 1970-х гг., т. е. до заноса ВИЧ-1 в страны Западной Европы (в конце 1970-х гг.). Далее произошло его распространение в Гавану и другие провинции Кубы [8, 10, 12]. К 2017 г. на этот генетический вариант приходилось 24,1% новых случаев ВИЧ-инфекции среди пациентов старше 18 лет [6].

Кроме CRF19_cpx, на Кубе широко распространён ещё один рекомбинант со сложной, мозаичной структурой генома — CRF18_cpx. По-видимому, он также имеет африканское происхождение и мог быть занесён с территории ДРК, Центральноафриканской Республики, Республики Камерун или Республики Ангола [1, 12, 13]. Структура генома CRF18_cpx более сложная, чем у CRF19_cpx, и представлена участками, идентичными вирусам субтипов A, F, G, H, K и U. При описании данного генетического варианта выявлены 40 генетически родственных образцов вирусов, включая вирусы CRF04_cpx и CRF13_cpx [13].

Период с середины 1980-х до середины 1990-х гг. отметился на Кубе появлениями в среде ВИЧ-инфицированных других рекомбинантных форм, включая BG-рекомбинанты [1]. Причём BG-рекомбинанты, циркулирующие на Кубе, имеют кубинское происхождение [3], став результатом рекомбинации вариантов ВИЧ-1 субтипов B и G, ранее уже циркулировавших на острове [1]. Вероятно, это событие произошло примерно в 1991 г. Все кубинские BG-рекомбинанты (CRF20, CRF23, CRF24) имеют общее происхождение от субтипа G из Цен-

[4] Информационный бюллетень ЮНЭЙДС по странам. Куба, 2023.
URL: https://www.unaids.org/en/regionscountries/countries/cuba

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-616

тральной Африки, циркулирующего в среде гетеросексуалов, и субтипа B (близкого к распространённому в США), циркулирующего среди МСМ в Гаване в начале 2000-х гг. Закономерно, что изначально BG-рекомбинанты были выявлены именно в среде МСМ в Гаване, а к 2003 г. определяли более 30% случаев ВИЧ-инфекции в столице Кубы [1, 8, 12].

Этот факт ярко иллюстрирует роль рекомбинации как одного из движущих факторов генетической изменчивости ВИЧ-1 и делает Кубу одной из «горячих точек рекомбинации ВИЧ-1» наряду с Мьянмой, Южным Китаем, Восточной Африкой, Аргентиной и Бразилией [8]. Более того, сформированные на Кубе рекомбинанты впоследствии стали распространяться по миру. Так, кубинский CRF20_BG обнаруживается в Испании и Греции [1].

Помимо упомянутых выше рекомбинантных форм, на Кубе циркулируют и другие варианты ВИЧ-1: как минимум 2 линии субтипа C из Восточной и Южной Африки [1]. Ставший прародителем BG-рекомбинантов ВИЧ-1 субтипа G с высокой долей вероятности имеет центральноафриканское происхождение [1]. Кроме того, отмечена активная циркуляция ВИЧ-1 субтипа H в провинции Сантьяго-де-Куба [12, 14]. Наконец, выявлены единичные случаи ВИЧ-инфекции, вызванной CRF05_DF, который ранее был зарегистрирован в Бельгии, ДРК, Испании и Коста-Рике [14].

Роль уязвимой группы МСМ в эпидемии ВИЧ-инфекции на Кубе является решающей. Если в 2002 г. чуть более 81% ВИЧ-инфицированных мужчин относились к МСМ [5], то в 1-м полугодии 2017 г. этот показатель достиг 94,31% [6]. И в настоящее время данная уязвимая группа является на Кубе доминирующей. Именно проникновение в среду МСМ ВИЧ-1 субтипа B в конце XX в. привело к активному распространению и доминированию этого варианта на Кубе [7]. Этот же фактор стал основой для увеличения генетического разнообразия на Кубе: уже в начале 2000-х гг. среди МСМ стали распространяться кубинские BG-рекомбинантные формы ВИЧ-1 [1, 8, 12].

Полномасштабное применение АРТ началось на Кубе в 2001 г. за счёт применения в первую очередь дженериков нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (НИОТ) и ненуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (ННИОТ) [6], что позволило достичь вирусологического успеха у 83% пациентов в 2017 г. и почти 86% — в 2023 г. [6]. Однако применение АРТ привело и к росту ЛУ в стране. В 2017 г. распространённость ЛУ у АРТ-наивных пациентов хотя бы к одному препарату составила 29,8%, что превышает данный показатель в 2007–2011 гг. (12,5%) и 2009–2012 гг. (20,2%) [6].

В 2017 г. первичная ЛУ к НИОТ составила 10,6%, а к ННИОТ — более 23%. Распространённость ЛУ высокого уровня к ННИОТ была связана с частой встречаемостью мутаций *K103N*, *G190A*, *Y181C* [6]. Причём достоверно чаще ЛУ выявлялась у людей 18–25 лет по сравнению с группами более старшего возраста.

Между генетическим разнообразием ВИЧ-1 на Кубе и в России есть значительные различия. В России с конца 1990-х гг. доминирует ВИЧ-1 суб-субтипа A6, распространившийся в России и странах бывшего СССР через потребителей инъекционных наркотиков [15, 16]. Вторым наиболее часто встречающимся вариантом ВИЧ-1 является рекомбинант CRF63_02A6, в последние годы активно распространяющийся в странах Центральной Азии и сибирском регионе России [15, 17].

В России выявлена циркуляция двух вариантов ВИЧ-1 субтипа B: Bwest, характерного для стран Западной Европы и Кубы, и Bfsu (IDU-B), чья циркуляция была отмечена на Дальнем Востоке России и который вместе с суб-субтипом A6 стал прародителем CRF03_AB [15, 16, 18, 19]. Также в России отмечена циркуляция субтипа C, CRF03_AB, суб-субтипа G ВИЧ-1 [15].

В последние годы в России часто выявляются уникальные и редкие AG-рекомбинантные формы, вероятно, заносимые из стран Центральной Азии [15].

Проблема ВИЧ-инфекции среди МСМ в России также имеет свои особенности, связанные, в первую очередь, с недостаточной изученностью этой уязвимой группы. Если до середины 1990-х гг. МСМ были основной уязвимой группой, то после проникновения ВИЧ-1 в среду потребителей инъекционных наркотиков именно данная группа стала основной уязвимой группой, а вклад МСМ в эпидемию ВИЧ-инфекции в России стал исчезающе низким [15, 16, 18, 20]. Во многом это может быть объяснено стигматизацией МСМ и отсутствием работ по мониторингу этой группы в России [18, 20]. Между тем существуют оценки вероятной распространённости ВИЧ-1 в среде МСМ в разных регионах страны — 5–25%, а ЮНЭЙДС в 2016 г. указывал на величину этого показателя в России в 6% [18].

В последние годы доля МСМ среди новых случаев ВИЧ-инфекции в России постепенно растёт. Так, на конец 2020 г. лишь 2,8% случаев ВИЧ-инфекции в стране были связаны с МСМ. К концу 2021 г. этот показатель увеличился до 3%, а к концу 2023 г. — до 4,1%[5].

В среде российских МСМ исторически доминировал Bwest, однако в недавнем прошлом наметилась тенденция к увеличению в этой уязвимой группе доли ВИЧ-1 суб-субтипа A6 [15, 18], что говорит о размытии границ данной уязвимой группы. Кроме того, выявлена циркуляция в среде

[5] Федеральный научно-методический центр по профилактике и борьбе со СПИДом. URL: http://www.hivrussia.info

российских МСМ BG-рекомбинантов, генетически близких к вирусам, циркулирующим в Испании и Португалии, но не относящихся к CRF20/23/24, распространённым на Кубе [21].

Что касается проблемы ЛУ ВИЧ-1 в России, то наиболее часто выявлялись мутации устойчивости в тех же позициях, что и для кубинских образцов, — *K103N/S*, *G190A/S*. Между тем вместо *Y181C* в российских образцах чаще обнаруживают замену *K101E*, вызывающую устойчивость ко всем ННИОТ [22].

С учетом вышеописанных особенностей ВИЧ-инфекции на Кубе и в России, а также роли МСМ в эпидемии ВИЧ-инфекции в обеих странах, **целью** нашего исследования был анализ генетических вариантов ВИЧ-1 и лекарственной устойчивости вируса в образцах плазмы крови, полученных от мигрантов-МСМ с Кубы, проживающих в Москве — одном из наиболее экономически развитых центров России, где исторически существует обширное сообщество МСМ и мигрантов.

Материалы и методы

Исследована коллекция образцов плазмы крови, полученных от МСМ — граждан Кубы в период с марта 2022 г. по июнь 2024 г. Одновременно производили сбор и обработку клинико-эпидемиологических данных: возраст, даты последнего отрицательного теста и первого положительного теста на ВИЧ-инфекцию, информация о вероятном месте и времени инфицирования, количестве половых партнеров, опыте приёма АРТ, а также о стадии ВИЧ-инфекции. Набор пациентов для включения в исследование проводили в сотрудничестве с некоммерческими организациями: Фондом «Шаги»[6] и Центром «LaSky»[7].

Средний возраст пациентов составил 30 лет (95% доверительный интервал (ДИ) 27,29–33,68). Большинство пациентов (n = 18; 66,67%) стали посещать Россию и жить в Москве в 2021–2023 гг., самый ранний визит в Россию у 1 пациента состоялся в 2018 г. Для основной части пациентов (n = 19; 70,37%) длительность ВИЧ-инфекции от момента постановки диагноза до включения в исследование составляла не более 1 мес. Для 4 пациентов длительность инфекции от момента выявления ВИЧ-1 составляла от 3,5 до 10 мес. Еще у 4 пациентов длительность инфекции была более 1,5 года.

Два пациента не имели представления о возможной дате и месте инфицирования, для 25 (92,59%) пациентов средняя длительность инфекции с момента предполагаемого инфицирования была более 2 лет (780 дней; 95% ДИ 377,91–1181,69). Но эти данные не точные, т. к. пациенты могли указать только год (n = 12) или год и месяц (n = 13) предполагаемого инфицирования. В общей сложности 15 (55,56%) пациентов заявляли Москву как вероятное место инфицирования. Ещё 10 пациентов предполагали, что их инфицирование произошло на Кубе. Предполагаемое место инфицирования учитывалось в дальнейшем анализе генетических вариантов ВИЧ-1 в образцах.

Пять пациентов на момент забора образца были трансгендерными лицами. Десять пациентов (4 из которых были трансгендерными лицами) относились к группе КСР. Ещё 2 пациента указывали на большое количество половых партнёров за последние 6 мес и не могли назвать точное число; 4 пациента имели 30, 20, 10 и 5 половых партнёров соответственно; 2 пациента — по 4, ещё 2 пациента — по 3; 5 пациентов указали 1 партнёра и 2 не имели связей за последние 6 мес.

Опыт терапии в прошлом был у 5 (22,72%) пациентов, но все они прекратили приём препаратов минимум за 3 мес до включения в исследование. Пациент M222 периодически принимал эфавиренз + тенофовира дизопроксила фумарат + ламивудин, делая перерывы в несколько месяцев. У пациента M208, включённого в исследование в 2024 г., был опыт приёма трувады (эмтрицитабин + тенофовира дизопроксила фумарат) в 2022 г. Наконец, 3 пациента (M80, M177, M223) имели опыт эпизодического приёма неустановленных средств АРТ.

В образцах плазмы крови была определена концентрация РНК ВИЧ-1 (вирусная нагрузка, ВН), количество CD4-лимфоцитов.

Получены нуклеотидные последовательности региона *pol* (позиции 2253–3353 референсного штамма HXB-2, номер GenBank K03455), кодирующего протеазу, и фрагмент обратной транскриптазы ВИЧ-1 в исследованных образцах. Секвенирование проводили с помощью набора реагентов «АмпліСенс HIV-Resist-Seq» (ЦНИИ Эпидемиологии) и генетического анализатора «Applied Biosystems» («Life Technologies»).

Проведён последовательный анализ, включающий предварительное определение генетического варианта с помощью онлайн-приложения HIVBlast[8], филогенетического анализа в программе «MEGA 6.0» [23] и кластерного анализа нуклеотидных последовательностей с помощью программы «ClusterPicker 1.2.3» (порог генетической дистанции 4,5% с bootstrap-поддержкой более 90%)[9].

[6] Фонд по профилактике социально значимых заболеваний «Шаги». URL: http://stepsfund.ru

[7] Низкопороговый центр профилактики ВИЧ-инфекции и поддержки людей, живущих с ВИЧ в Москве и Московской области. URL: https://lasky.ru

[8] Los Alamos National Laboratory. HIV BLAST. URL: https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/BASIC_BLAST/basic_blast.html

[9] Leigh Brown HIV Research Group. Picking and Describing HIV

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-616
ORIGINAL RESEARCHES

Для проведения филогенетического и кластерного анализов полученная выборка была дополнена нуклеотидными последовательностями кубинских пациентов ($n = 430$) из международной базы данных ВИЧ-1 Института Лос-Аламос (США)[10], описанными в публикациях, посвящённых анализу образцов ВИЧ-1, выделенных на территории Кубы в 2007–2017 гг. [3, 6, 10]. Для филогенетического анализа геномов, генетически близких к циркулирующим в России вариантам ВИЧ-1, применяли подборку референтных последовательностей, использованную ранее при анализе вариантов ВИЧ-1, циркулировавших в странах Восточной Европы и Центральной Азии в 2010–2019 гг. [15].

Анализ ЛУ ВИЧ-1 проводили с помощью онлайн-приложения HIVdb базы данных Стэндфордского университета[11] с определением как самих мутаций устойчивости, так и уровня ЛУ на основании подсчёта баллов Stanford Penalty Score [22, 24].

Полученные в ходе работы нуклеотидные последовательности были депонированы в Российскую базу данных устойчивости ВИЧ к антиретровирусным препаратам — RuHIV (https://ruhiv.ru/) под номерами RHD10698, RHD10712, RHD10720, RHD10721, RHD10725, RHD10727, RHD10733-RHD10736, RHD10739, RHD16068, RHD16123, RHD16132, RHD17497, RHD17505, RHD17513, RHD17514, RHD20769, RHD20773, RHD20782, RHD20783, RHD20796-RHD20798, RHD20806, RHD20813.

Данное исследование было одобрено ЛЭК ЦНИИ Эпидемиологии (протокол № 142 от 25.04.2024).

Результаты

Средний уровень ВН составил 5,33 (95% ДИ 5,19–5,44) log копий/мл, среднее число CD4-лимфоцитов — 405 (95% ДИ 296,34–513,34) клеток/мкл. Для 23 (85,19%) пациентов была определена 2а стадия ВИЧ-инфекции. Еще 4 пациента были на 3-й стадии. Не выявлено достоверных различий между стадией ВИЧ-инфекции и величиной ВН или числом CD4-лимфоцитов.

Был проведён анализ генетических вариантов ВИЧ-1 в образцах на основе поиска максимально генетически близких референтных последовательностей из базы данных GenBank с помощью онлайн-приложения HIVBlast. Результаты анализа представлены в **таблице**. Генетически близким с референтными последовательностями ВИЧ-1 с Кубы оказался 21/27 (77,78%) образец. При этом 12 (57,14%) из 21 пациентов, инфицированных этими вариантами ВИЧ-1, предполагали, что их инфицирование произошло в Москве, а не на Кубе.

Два пациента были инфицированы ВИЧ-1 субтипа С, типичным для Ботсваны. Ещё 2 пациента имели ВИЧ-1 субтипа В, близкого к вирусам, выделенным в Германии: пациент М151, инфицированный ВИЧ-1 субтипа В, предполагал свое заражение на Кубе, а пациент М80 — в Москве.

Лишь от 2 пациентов были получены образцы ВИЧ-1, типичные для России: один пациент был инфицирован вирусом суб-субтипа А6, а ещё один — вирусом, генетически близким к референтам субтипа В из Чехии и России, причём российские референтные вирусы А6 и В были выделены от пациентов-мужчин с гомосексуальным и с гетеросексуальным путём передачи ВИЧ-1 в 2019 и 2015 гг. соответственно.

Полученные результаты предварительного генотипирования были в основной массе подтверждены филогенетическим анализом с референтными

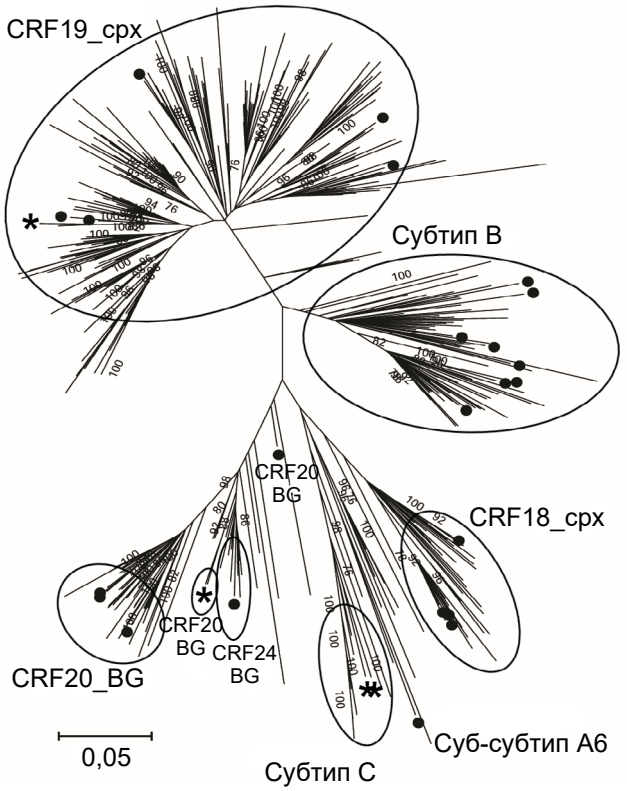


Рис. 1. Результаты филогенетического и кластерного анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *pol* (позиции 2253–3353) исследуемой коллекции образцов ВИЧ-1 ($n = 27$) и группы сравнения ($n = 430$) кубинских образцов ВИЧ-1.

Филогенетический анализ проведён по методу максимального правдоподобия с использованием GTR+G+I-модели нуклеотидных замен в 500 независимых построениях. Кластерный анализ проводили с порогом генетической дистанции 4,5% и bootstrap-поддержкой более 90%. Последовательности исследуемой коллекции, сформировавшие кластеры, обозначены звездочками, не образовавшие — чёрными кружками.

Clusters in Phylogenetic Trees.
URL: https://hiv.bio.ed.ac.uk/software.html

[10] Los Alamos National Laboratory. HIV databases.
URL: https://www.hiv.lanl.gov

[11] Stanford HIV Drug Resistance Database.
URL: https://hivdb.stanford.edu

нуклеотидными последовательностями ВИЧ-1, выделенными от кубинских пациентов в 2007–2017 гг. (**рис. 1**). Эта же подборка референтных последовательностей и исследуемых геномов (n = 457) была подвергнута кластерному анализу.

Выявлены 3 кластера, образованных исследуемыми образцами:

1) кластер, образованный 2 образцами ВИЧ-1 субтипа C от эпидемиологически связанных пациентов M185 и M186;

2) кластер, образованный образцом от пациента M222 и референтом MK817363;

3) кластер, образованный образцом M160 и референтными последовательностями MZ004165 и MZ004178.

Пациент M222 — КСР, практикующий секс под химическими препаратами. ВИЧ-инфекция была выявлена у него в 2013 г., а предполагаемым местом заражения в том же 2013 г. была Куба. Поэтому не является неожиданностью формирование кластера между M222 и MK817363 — вирусом CRF20_BG, изолированным на Кубе в 2017 г. Интересно, что изначально этот образец в программе HIVBlast был идентифицирован как CRF24_BG (таблица), поскольку по исследуемому генетическому фрагменту CRF20 и CRF24 очень близки. Кластерный анализ позволил скорректировать эти данные, отнеся исследуемый образец к CRF20.

В то же время пациент M160, чей образец образовал общий кластер с образцами CRF19_cpx MZ004165 и MZ004178, выделенными в Гаване в 2013 г. от мужчины и женщины соответственно, также был КСР и трансгендерной персоной. ВИЧ-инфекция у пациента была выявлена в июне 2023 г., а предполагаемые место и дата инфицирования — Москва, январь 2022 г.

Результаты предварительного генотипирования нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 в онлайн-приложении HIVBlast

Образец	Предполагаемое место инфицирования	Референтная последовательность в HIVBlast			
		номер GenBank	генетический вариант	страна	генетическая близость, %
M52	Москва	MZ004274	CRF19_cpx	Куба	98
M67	Москва	MZ004382	CRF19_cpx	Куба	95
M75	Москва	MK817409	CRF20_BG	Куба	98
M76	Москва	MK817388	CRF20_BG	Куба	96
M80	Москва	MH471360	Субтип B	Германия	96
M82	Москва	MH667011	Субтип B	Россия	98
M88	Москва	DQ113271	CRF19_cpx	Куба	95
M89	Москва	MZ004339	CRF19_cpx	Куба	96
M90	Не известно	DQ113301	Субтип B	Куба	96
M91	Москва	JQ585469	Субтип B	Куба	97
M94	Москва	DQ113060	CRF19_cpx	Куба	96
M96	Москва	OL792340	Суб-субтип A6	Россия	97
M151	Куба	KJ770458	Субтип B	Германия	96
M160	Москва	MZ004178	CRF19_cpx	Куба	97
M169	Москва	MK817435	CRF18_cpx	Куба	96
M177	Москва	AY900579	CRF24_BG	Куба	97
M185	Куба	KR860993	Субтип C	Ботсвана	95
M186	Куба	KR860993	Субтип C	Ботсвана	94
M195	Москва	JN000054	CRF20_BG	Куба	97
M199	Куба	JN000009	Субтип B	Куба	97
M208	Куба	MK817498	CRF18_cpx	Куба	96
M209	Куба	MK817361	Субтип B	Куба	97
M222	Куба	JN000021	CRF24_BG	Куба	96
M223	Куба	MK817465	CRF18_cpx	Куба	96
M224	Не известно	DQ020274	CRF20_BG	Куба	90
M232	Куба	MK817454	CRF18_cpx	Куба	98
M240	Куба	DQ113256	Субтип B	Куба	96

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-616

Образцы от пациентов M82 и M96, генетически близкие российским вирусам субтипа B и суб-субтипа A6 соответственно, были подвергнуты дополнительному филогенетическому анализу с референтными последовательностями циркулирующих в России генетических вариантов ВИЧ-1 (**рис. 2**). Образец M96 в 82% возможных построений образовывал общую ветвь с референтами суб-субтипа A6 AF413987 и AY500393. Образец M82, в свою очередь, с достоверностью в 78% образовывал общую ветвь с российским референтом Bwest AY819715 и основным мировым референтом этой же линии HXB-2 K03455.

Ни в одном образце ВИЧ-1 не было выявлено ЛУ к ингибиторам протеазы (**рис. 3**). ЛУ к хотя бы одному ингибитору обратной транскриптазы была выявлена в 9 (33,33%; 95% ДИ 15,55–51,11) образцах, причём 3 (11,11%; 95% ДИ 0–22,97) образца (один CRF19_cpx и два CRF20_BG) имели устойчивость и к НИОТ, и к ННИОТ. Типичные для России вирусы из упомянутых выше образцов от пациентов M82 и M96 не содержали ЛУ, как и вирусы субтипа C от пациентов M185 и M186 и ВИЧ-1 субтипа B от пациента M80. Наиболее часто (в 29,63% образцов; 95% ДИ 12,41–46,85) выявлялась ЛУ (преимущественно высокого уровня) к ННИОТ эфавирензу и невирапину, что было связано с мутациями *K103N*, *Y181C* и *P225H* (рис. 3).

Устойчивость к рилпивирину также была связана с присутствием мутаций *Y181C*, *K101E* и *E138A*. Наконец, ЛУ высокого уровня к НИОТ эмтрицитабину и ламивудину у вируса в 2 (7,41%; 95% ДИ 0–17,29) образцах была связана с наличием мутации *M184V*.

У 6 из 9 пациентов, инфицированных ВИЧ-1 с ЛУ, не было опыта терапии, а у 3 — был опыт в прошлом. Пациент M222 с опытом приёма эфавиренз + тенофовир дизопроксил + ламивудин имел вирус с ЛУ высокого уровня к эфавирензу (и перекрестной ЛУ к невирапину) и ламивудину из-за

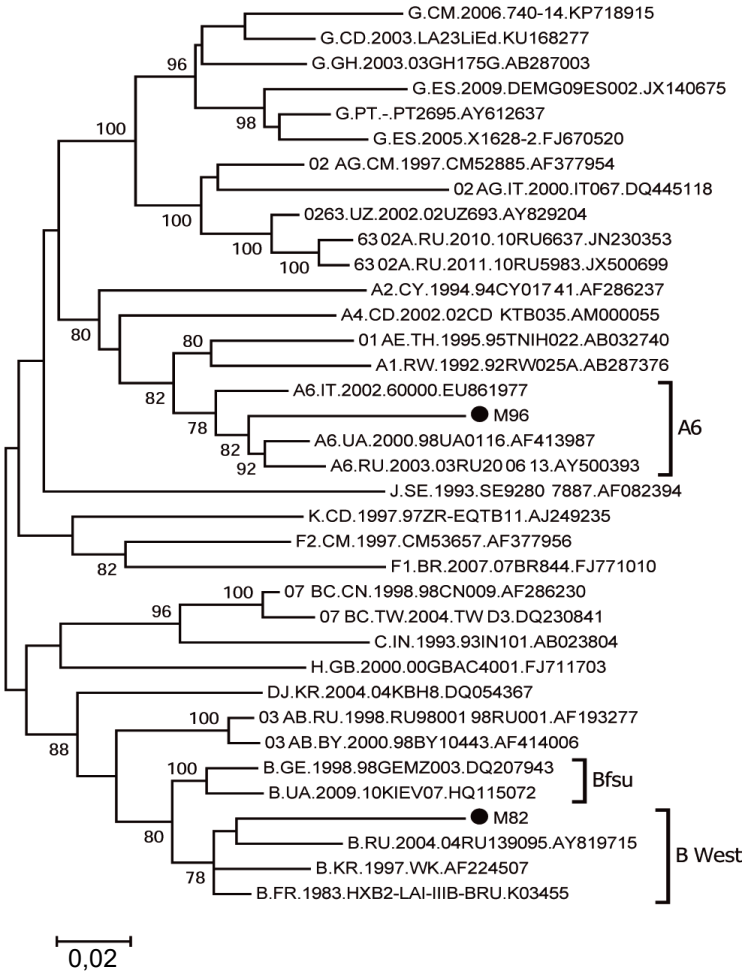


Рис. 2. Результаты филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *pol* (позиции 2253–3353) образцов ВИЧ-1 от пациентов M82 и M96, предположительно принадлежащих к генетическим вариантам, циркулирующим в России.

Филогенетический анализ проведён по методу максимального правдоподобия с использованием HKY+G-модели нуклеотидных замен и bootstrap-поддержкой 500. Последовательности M82 и M96 обозначены чёрными кружками.
Подветви, образованные вирусами суб-субтипа A6, генетическими вариантами Bwest и Bfsu, выделены рамками.

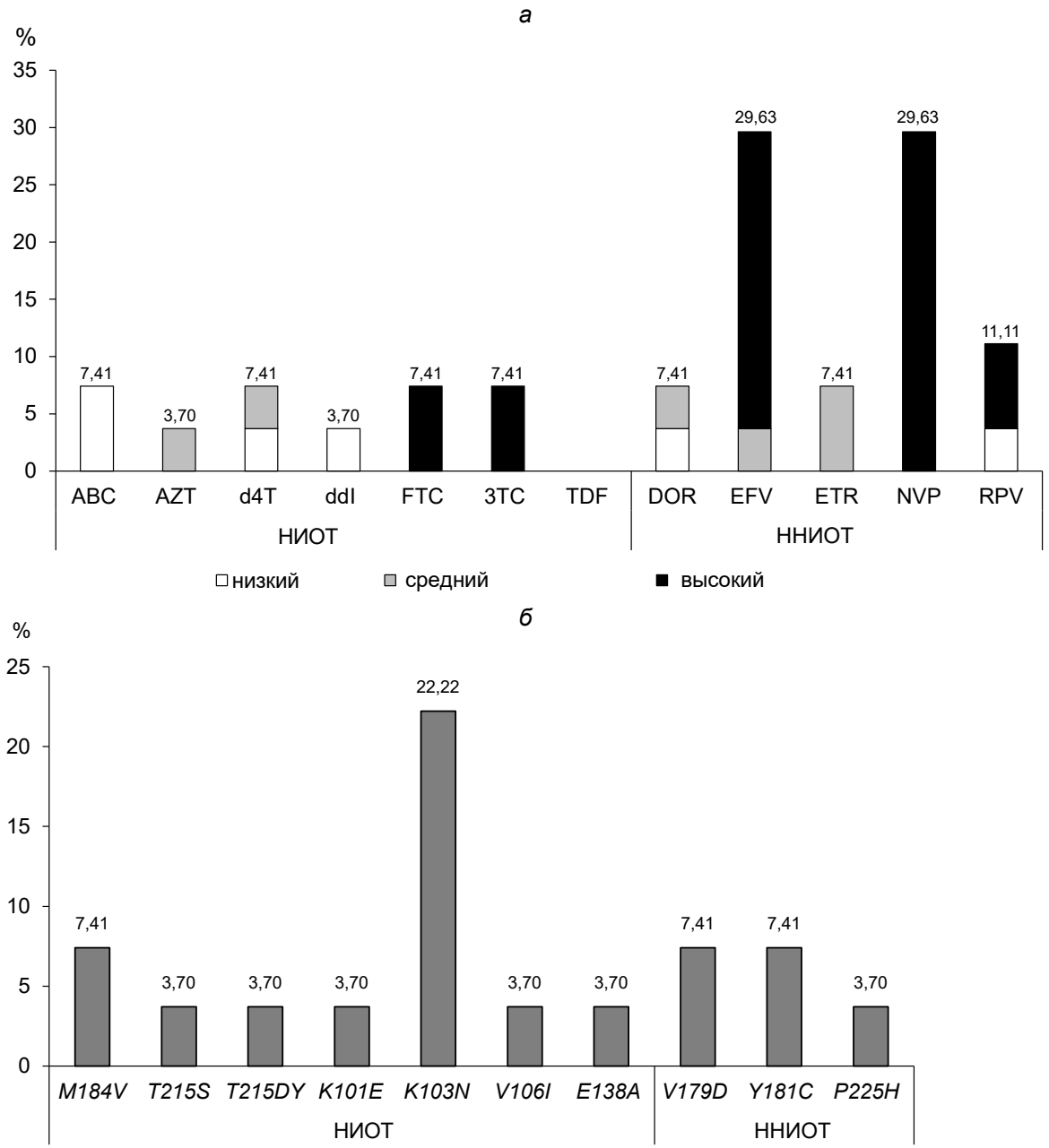


Рис. 3. Результаты анализа частоты встречаемости ЛУ (*а*) и мутаций ЛУ к ингибиторам ВИЧ-1 классов НИОТ и ННИОТ (*б*).

ABC — абакавир; AZT — зидовудин; d4T — ставудин; ddI — диданозин; FTC — эмтрицитабин; 3TC — ламивудин; TDF — тенофовир дизопроксил; DOR — доравирин; EFV — эфавиренз; ETR — этравирин; NVP — невирапин; RPV — рилпивирин.
Анализ проведён с помощью онлайн-приложения HIVdb, степень устойчивости была определена на основании подсчёта баллов Stanford Penalty Score.

сочетания мутаций *M184V*, *K103N* и *P225H*. У пациента M208 с опытом приёма трувады за 2 года до исследования был выявлен ВИЧ-1 только с мутацией *K103N*, вызывающей ЛУ высокого уровня к эфавирензу и невирапину. Эту же замену содержал вирус в образце пациента M223.

Обсуждение

Полученные нами результаты определения генетического варианта ВИЧ-1 говорят о том, что абсолютное большинство пациентов — 21 (77,78%), было инфицировано вариантом вируса, типичным для страны происхождения пациента — Кубы. В случае 12 из 15 пациентов, указавших в качестве вероятного места инфицирования Москву, либо имело место заражения от гражданина Кубы или общего с ним полового партнера, либо неверная оценка места вероятного заражения. Выявленные нами 2 случая инфекции типичным для Ботсваны вирусом субтипа C, скорее всего, произошли на территории

DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-616

Кубы, как и предполагали пациенты, т. к. на Кубе в 2013 г. были выявлены «африканские» варианты ВИЧ-1 [1]. То же касается пациента M151, у которого выявлена ВИЧ-инфекция вирусом субтипа B, генетически близким к вирусу, циркулирующему на территории Германии, что отражает связь эпидемии ВИЧ-инфекции на Кубе и в Западной Европе [1, 7].

Два образца — M222 (CRF20_BG) и M160 (CRF19_cpx) — образовали два «активных» (расширяющихся) кластера, в которые вошли также образцы, выделенные от кубинцев в другой временной период (разница в 4 года и 10 лет соответственно). Это говорит о продолжении циркуляции и дальнейшем распространении этих вирусных генетических линий в мире.

Таким образом, в общей сложности 24 (88,88%) исследованных нами МСМ — граждан Кубы, проживающих в Москве, вероятно, были инфицированы либо на родине, либо от своего согражданина. Лишь 3 пациента могли быть инфицированы на территории России:

- пациенты M82 и M96, инфицированные ВИЧ-1, типичными для территории России;
- пациент M80, инфицированный вирусом субтипа B, генетически близким к штамму, циркулирующему на территории Германии. Между тем циркуляция западноевропейских вариантов ВИЧ-1 типична для уязвимой группы МСМ в России [18, 20, 21].

Полученные нами данные о частоте встречаемости ЛУ имеют низкую статистическую достоверность из-за небольшого размера выборки (n = 27), что не позволяет достоверно сравнивать наши результаты с опубликованными данными о ЛУ ВИЧ-1 на Кубе. Мы выявили ЛУ в 9 образцах вируса, 3 из которых были получены от пациентов, имевших опыт терапии. Наиболее часто выявляемая ЛУ высокого уровня к эфавирензу и невирапину — тенденция последних лет в России и странах с низким и средним уровнем дохода населения [22, 24]. Наличие ВИЧ-1 с ЛУ у 6 (25%; 95% ДИ 8,67-41,33) из 24 пациентов, вероятно получивших ВИЧ-1 от граждан Кубы, является следствием проблемы распространения ЛУ на Кубе [6]. При этом применение эффективных схем терапии может стать залогом вирусологического успеха даже на фоне устойчивости ВИЧ-1 к эфавирензу и невирапину.

Заключение

Наши результаты говорят о вкладе миграции с Кубы в генетическое разнообразие ВИЧ-1 среди МСМ в Москве в последние годы и о её влиянии на распространение ЛУ ВИЧ-1 в этой уязвимой группе. Однако достоверные данные о степени такого влияния могут быть получены лишь при исследовании более широкой выборки пациентов группы МСМ. Таким образом, фактор миграции должен учитываться в программах профилактики и противодействия распространению ВИЧ-инфекции в России, а для эффективного лечения пациентов с ЛУ-вариантами ВИЧ-1 необходим подбор эффективной схемы терапии.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ|REFERENCES

1. Delatorre E., Bello G. Phylodynamics of the HIV-1 epidemic in Cuba. *PLoS One*. 2013;8(9):e72448. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072448
2. Frescura L., Godfrey-Faussett P., Feizzadeh A.A., et al. Achieving the 95 95 95 targets for all: A pathway to ending AIDS. *PLoS One.* 2022;17(8):e0272405. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272405
3. Kouri V., Khouri R., Alemán Y., et al. CRF19_cpx is an evolutionary fit HIV-1 variant strongly associated with rapid progression to AIDS in Cuba. *EBioMedicine*. 2015;2(3):244–54. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.01.015
4. Rolo F., Miranda L., Wainberg M., et al. Envelope V3 region sequences of Cuban HIV-1 isolates. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol*. 1995;9(2):123–5.
5. Cuevas M.T., Ruibal I., Luisa M., et al. Villahermosa high HIV-1 genetic diversity in Cuba. *AIDS*. 2002;16(12):1643–53. DOI: https://doi.org/10.1097/00002030-200208160-00010
6. Machado L.Y., Blanco M., López L.S., et al. National survey of pre-treatment HIV drug resistance in Cuban patients. *PLoS One*. 2019;14(9):e0221879. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221879
7. Machado-Zaldívar L.Y., Díaz-Torres H.M., Blanco-de Armas M., et al. Origin and evolutionary history of HIV-1 subtype B in Cuba. *MEDICC Rev*. 2017;19(2-3):40. DOI: https://doi.org/10.37757/MR2017.V19.N2-3.7
8. Pérez L., Thomson M.M., Bleda M.J. HIV type 1 molecular epidemiology in Cuba: high genetic diversity, frequent mosaicism, and recent expansion of BG intersubtype recombinant forms. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2006;22(8):724–33. DOI: https://doi.org/10.1089/aid.2006.22.724
9. Casado G., Thomson M.M., Sierra M., et al. Identification of a novel HIV-1 circulating ADG intersubtype recombinant form (CRF19_cpx) in Cuba. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2005;40(5):532–7. DOI: https://doi.org/10.1097/01.qai.0000186363.27587.c0
10. Zhukova A., Voznica J., Dávila F.M., et al. Cuban history of CRF19 recombinant subtype of HIV-1. *PLoS Pathog*. 2021;17(8): e1009786. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009786
11. Powell R.L.R., Zhao J., Konings F.A.J., et al. Circulating recombinant form (CRF) 37_cpx: an old strain in Cameroon composed of diverse, genetically distant lineages of subtypes A and G. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2007;23(7):923–33. DOI: https://doi.org/10.1089/aid.2007.0040..
12. Sierra M., Thomson M.M., Posada D. Identification of 3 phylogenetically related HIV-1 BG intersubtype circulating recombinant forms in Cuba. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr*. 2007;45(2):151–60. DOI: https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e318046ea47
13. Thomson M.M., Casado G., Posada D. Identification of a novel HIV-1 complex circulating recombinant form (CRF18_cpx) of Central African origin in Cuba. *AIDS*. 2005;19(11):1155–63. DOI: https://doi.org/10.1097/01.aids.0000176215.95119.1d
14. Machado L.Y., Blanco M., Dubed M., et al. HIV type 1 genetic diversity in newly diagnosed Cuban patients. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2012;28(8):956–60. DOI: https://doi.org/10.1089/aid.2011.0295
15. Лаповок И.А., Кириченко А.А., Шлыкова А.В. и др. Молекулярно-эпидемиологический анализ генетических вариантов ВИЧ-1, циркулировавших в странах Восточной Европы и

Центральной Азии в 2010–2019 гг. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2022;12(3):31–40. Lapovok I.A., Kirichenko A.A., Shlykova A.V., et al. Molecular epidemiological analysis of HIV-1 genetic variants circulating in the countries of Eastern European and Central Asia in 2010–2019. *Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items.* 2022;12(3):31–40. DOI: https://doi.org/10.18565/epidem.2022.12.3.31-40 EDN: https://elibrary.ru/poaufi

16. Bobkova M. Current status of HIV-1 diversity and drug resistance monitoring in the former USSR. *AIDS Rev.* 2013;15(4):204–12.
17. Kostaki E.G., Karamitros T., Bobkova M., et al. Spatiotemporal characteristics of the HIV-1 CRF02_AG/CRF63_02A1 epidemic in Russia and Central Asia. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2018;34(5):415–20. DOI: https://doi.org/10.1089/aid.2017.0233
18. Kazennova E., Laga V., Gromov K., et al. Genetic variants of HIV type 1 in men who have sex with men in Russia. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2017;33(10):1061–4. DOI: https://doi.org/10.1089/aid.2017.0078
19. Лаповок И.А., Лопатухин А.Э., Киреев Д.Е. и др. Молекулярно-эпидемиологический анализ вариантов ВИЧ-1, циркулировавших в России в 1987–2015 гг. *Терапевтический архив.* 2017;89(11):44–9. Lapovok I.A., Lopatukhin A.E., Kireev D.E., et al. Molecular epidemiological analysis of HIV-1 variants circulating in Russia in 1987–2015. *Terapevticheskiy arkhiv.* DOI: https://doi.org/10.17116/terarkh2017891144-49 EDN: https://elibrary.ru/zwosol
20. Лаповок И.А., Кириченко А.А., Шлыкова А.В. и др. Анализ генетических вариантов ВИЧ-1 среди мужчин-мигрантов гомосексуальной ориентации, проживающих в Москве. *Журнал инфектологии*. 2023;15(2 S2):71–2. Lapovok I.A., Kirichenko A.A., Shlykova A.V., et al. Analysis of HIV-1 genetic variants among homosexual male migrants living in Moscow. *Journal Infectology*. 2023;15(2 S2):71–2. EDN: https://elibrary.ru/qtszlb
21. Murzakova A., Kireev D., Baryshev P., et al. Molecular epidemiology of HIV-1 subtype G in the Russian Federation. *Viruses*. 2019;11(4):348. DOI: https://doi.org/10.3390/v11040348
22. Kirichenko A., Kireev D., Lapovok I., et al. HIV-1 drug resistance among treatment-naïve patients in Russia: analysis of the national database, 2006–2022. *Viruses.* 2023;15(4):991. DOI: https://doi.org/10.3390/v15040991
23. Tamura K., Stecher G., Peterson D., et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol*. 2013;30(12):2725–9. DOI: https://doi.org/10.1093/molbev/mst197
24. Kirichenko A., Kireev D., Lopatukhin A., et al. Prevalence of HIV-1 drug resistance in Eastern European and Central Asian countries. *PLoS One*. 2022;17(1):e0257731. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257731

Информация об авторах

Лаповок Илья Андреевич✉ — канд. биол. наук, с. н. с. лаб. диагностики и молекулярной эпидемиологии ВИЧ-инфекции ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, i_lapovok@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-6328-1415

Кириченко Алина Алексеевна — канд. мед. наук, с. н. с. лаб. диагностики и молекулярной эпидемиологии ВИЧ-инфекции ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, kirichenko@cmd.su, https://orcid.org/0000-0002-7116-0138

Шлыкова Анастасия Вениаминовна — н. с. лаб. диагностики и молекулярной эпидемиологии ВИЧ-инфекции ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, murzakova_a.v@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-1390-8021

Киреев Дмитрий Евгеньевич — канд. биол. наук, зав. лаб. диагностики и молекулярной эпидемиологии ВИЧ-инфекции ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, dmitkireev@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0002-7896-2379

Попова Анна Анатольевна — канд. мед. наук, с. н. с. Специализированного научно-исследовательского отдела по профилактике и борьбе со СПИДом ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия; доцент каф. инфекционных болезней РМАНПО, Москва, Россия, asya-med@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-9484-5917;

Покровская Анастасия Вадимовна — д-р мед. наук, с. н. с. ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия; профессор каф. инфекционных болезней с курсами эпидемиологии и фтизиатрии Медицинского института РУДН им. Патриса Лумумбы, Москва, Россия, pokrovskaya@cmd.su, https://orcid.org/0000-0002-2677-0404.

Участие авторов: *Лаповок И.А., Кириченко А.А., Шлыкова А.В.* — подбор и анализ литературы, анализ данных, статистическая обработка, написание текста, редактирование; *Киреев Д.Е., Попова А.А., Покровская А.В.* — концепция и дизайн исследования, организация сбора материала, редактирование. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 14.10.2024;
принята к публикации 28.12.2024;
опубликована online 28.02.2025;
опубликована 28.09.2025

Information about the authors

Ilya A. Lapovok✉ — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, HIV diagnostic and molecular epidemiology laboratory, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, i_lapovok@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-6328-1415

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

Anastasia V. Shlykova — researcher, HIV diagnostic and molecular epidemiology laboratory, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, murzakova_a.v@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-1390-8021

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

Anna A. Popova — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Department of specialized research laboratory for AIDS epidemiology and prevention, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia; Associate Professor, Department of infectious diseases, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia, asya-med@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-9484-5917

Anastasia V. Pokrovskaya — D. Sci. (Med.), senior researcher, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia; Professor, Department of infectious diseases with courses of epidemiology and phthisiology, Medical Institute, Peoples' Friendship University, Moscow, Russia, pokrovskaya_av@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-2677-0404

Author contribution: *Lapovok I.A., Kirichenko A.A., Shlykova A.V.* — literature selection and analysis, data analysis, statistical processing, writing the text, editing; *Kireev D.E., Popova A.A., Pokrovskaya A.V.* — study concept and design, organization of biomaterial collection, editing. All authors made a significant contribution to the search and analytical work and preparation of the article, read and approved the final version before publication.

The article was submitted 14.10.2024;
accepted for publication 28.12.2024;
published online 28.02.2025;
published 28.09.2025

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-722
ORIGINAL RESEARCHES

Оригинальное исследование
https://doi.org/10.36233/0372-9311-722

Этиологическая структура острых кишечных инфекций по результатам экстерриториального мониторинга

Макарова М.А.[1,2]✉, Бальдэ Р.[3], Кафтырева Л.А.[1,2], Матвеева З.Н.[1], Жамборова С.Х.[1]

[1]Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
[2]Северо-Западная медицинская академия имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;
[3]Научно-исследовательский институт прикладной биологии Гвинеи, Киндия, Республика Гвинея

Аннотация

Введение. Острые кишечные инфекции (ОКИ) вызывают высокую заболеваемость и смертность, особенно в Африке и Юго-Восточной Азии, где каждый год умирают миллионы детей младше 5 лет. Республика Гвинея остро нуждается в проведении широкомасштабных исследований, направленных на изучение причин диарейных заболеваний, необходимых для разработки эффективных мер профилактики, обеспечивающих сохранение здоровья её населения.

Цель — провести анализ этиологической структуры ОКИ в Гвинейской Республике.

Материалы и методы. Пробы испражнений ($n = 724$) жителей Гвинейской Республики с диарейным синдромом изучали методом ПЦР в реальном времени с двумя наборами реагентов: 1) «АмплиСенс ОКИ скрин-FL» для выявления ДНК (РНК) микроорганизмов *Shigella* spp./EIEC, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Adenovirus*, *Rotavirus*, *Norovirus* и *Astrovirus*; 2) «АмплиСенс Эшерихиозы-FL» для выявления ДНК диареегенных *Escherichia coli* (DEC) 5 патогрупп: EPEC, EHEC, ETEC, EIEC, EAgEC.

Результаты. В 2019–2022 гг. у 66,2% обследованных детей и взрослых обнаружены генетические детерминанты ОКИ, преимущественно бактериальной этиологии (74,1%), среди которых доминировали диареегенные *E. coli* (62,4%). Генетические маркеры вирусных патогенов выявлялись значительно реже — 25,9% ($p < 0,05$). Дети раннего возраста наиболее уязвимы перед инфекцией, вызванной DEC. Бактериальные возбудители доминируют как в случаях моноинфекций, так и при сочетанном заражении двумя и более видами патогенов.

Заключение. Исследование показало, что DEC являются основной причиной ОКИ в Гвинее. Полученные данные станут основой для разработки эффективной программы профилактики и лечения ОКИ в республике.

Ключевые слова: *диарейный синдром, острые кишечные инфекции, генетические детерминанты, полимеразная цепная реакция, Африка, Гвинейская Республика*

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов или их законных представителей. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (протокол № 27 от 02.07.2019).

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

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

Для цитирования: Макарова М.А., Бальдэ Р., Кафтырева Л.А., Матвеева З.Н., Жамборова С.Х. Этиологическая структура острых кишечных инфекций по результатам экстерриториального мониторинга. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2025;102(4):436–444.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-722
EDN: https://www.elibrary.ru/XSKWOC

© Макарова М.А., Бальдэ Р., Кафтырева Л.А., Матвеева З.Н., Жамборова С.Х., 2025

Original Study Article
https://doi.org/10.36233/0372-9311-722

Etiological structure of acute intestinal infections based on the results of exterritorial monitoring

Maria A. Makarova[1,2]✉, Ramatoulay Balde[3], Lidiya A. Kaftyreva[1,2], Zoya N. Matveeva[1], Samida Kh. Zhamborova[1]

[1]St. Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia;
[2]I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russia;
[3]Research Institute of Applied Biology of Guinea, Kindia, Republic of Guinea

Abstract

Introduction. Acute intestinal infections cause high morbidity and mortality, especially in Africa and Southeast Asia, where millions of children under the age of five die every year. The Republic of Guinea urgently requires large-scale research aimed at studying the causes of diarrheal diseases, necessary for the development of effective preventive measures to ensure the preservation of the health of its population.

Aim. To conduct a analysis of the etiological structure of acute intestinal infections in the Republic of Guinea.

Materials and methods. Stool samples (n = 724) from residents of the Republic of Guinea with diarrheal syndrome were studied by real-time PCR with two reagent kits: 1) AmpliSens OKI screen-FL for the detection of DNA (RNA) of microorganisms *Shigella* spp./EIEC, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Adenovirus*, *Rotavirus*, *Norovirus* and *Astrovirus*; 2) AmpliSens Escherichiosis-FL for the detection of DNA of diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) of five pathogroups: EPEC, EHEC, ETEC, EIEC, EAgEC.

Results. In the period 2019-2022, 66.2% of the examined children and adults revealed the presence of genetic markers of acute intestinal infections, mainly of bacterial etiology (74.1%), among which diarrheagenic *E. coli* dominated (62.4%). Genetic markers of viral pathogens were detected significantly less frequently by 25.9%, $p < 0.05$. Young children are most vulnerable to infection caused by *E. coli*. Bacterial pathogens dominate both in cases of monoinfections and in cases of mixed infection with two or more types of pathogens.

Conclusion. A study has shown that DEC is the main cause of intestinal infections in Guinea. The data obtained will become the basis for the development of an effective program for the prevention and treatment of acute intestinal infections in the republic.

Keywords: *diarrhea, acute intestinal infections, genetic determinants, PCR, Africa, Republic of Guinea*

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients or their legal representatives. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Pasteur St. Petersburg Research Institute of Epidemiology and Microbiology (protocol No. 27 dated 02.07.2019).

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

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

For citation: Makarova M.A., Balde R., Kaftyreva L.A., Matveeva Z.N., Zhamborova S.Kh. Etiological structure of acute intestinal infections based on the results of exterritorial monitoring. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2025;102(4):436–444.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-722
EDN: https://www.elibrary.ru/XSKWOC

Введение

Острые кишечные инфекции (ОКИ) представляют собой глобальную проблему здравоохранения и приводят к высоким показателям заболеваемости и смертности во многих странах [1]. Ежегодно во всём мире от диареи умирают около 1,6 млн человек, причём подавляющее большинство случаев фиксируется в развивающихся странах [2]. Диарейные заболевания являются причиной 15% смертей детей раннего и младшего возрастов, из которых около 80% приходится на регионы Африки и Юго-Восточной Азии [3, 4]. Несмотря на то что за последние четверть века смертность от диареи существенно сократилась в мировом масштабе, большинство африканских стран продолжают сталкиваться с высоким уровнем распространённости тяжёлых форм ОКИ [5]. По оценкам экспертов, к 2030 г. 4,4 млн детей в возрасте до 5 лет будут ежегодно умирать от инфекционных заболеваний, при этом 60% случаев будут регистрироваться в странах Африки [6, 7].

Для Африканского континента диарейные болезни остаются актуальной угрозой, особенно остро проявляясь в условиях глубокой бедности [8, 9]. В рамках Декларации тысячелетия ООН, принятой

© Makarova M.A., Balde R., Kaftyreva L.A., Matveeva Z.N., Zhamborova S.Kh., 2025

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-722

в 2000 г., были поставлены важные цели, направленные на борьбу с бедностью, недоеданием, на обеспечение всеобщего доступа к чистой питьевой воде, а также значительное сокращение детской смертности[1]. Однако современные реалии показывают, что многие африканские страны не смогут достичь этих ориентиров вовремя, учитывая, что лишь треть населения обладает регулярным доступом к чистой воде [10–12]. Этот факт создаёт дополнительные риски распространения диарейных заболеваний среди значительной части населения региона[2].

Согласно данным международного проекта Global Enterics Multi-center Study (GEMES), в нескольких африканских государствах — Кении, Мали, Мозамбике и Гамбии, диареегенные *Escherichia coli* (DEC) и *Cryptosporidium* признаны наиболее опасными возбудителями смертельных случаев от диареи детей до 5 лет. Исследовательские работы, проведённые в 18 странах Африки, посвящённые бремени диарейных заболеваний эшерихиозной этиологии, показали, что энтероагрегативные *E. coli* (EAgEC) являются более распространённой патогруппой DEC (69% случаев), чем энтеротоксигенные *E. coli* (ETEC), энтеропатогенные *E. coli* (EPEC), шигатоксин-продуцирующие *E. coli* (STEC) и энтероинвазивные (EIEC), с различиями распространённости в диапазоне 6,6–18,6% [2].

В отличие от развитых регионов, таких как США и Европа, располагающих хорошо организованными системами мониторинга кишечных инфекций, включая DEC[3], большинство стран Африканского континента испытывают серьёзные трудности в формировании эффективной инфраструктуры здравоохранения и полноценного контроля за ОКИ.

Этиология возбудителей ОКИ разнообразна, что обусловливает различия эпидемического процесса в странах, различающихся уровнем экономического развития. Именно поэтому определение ключевых патогенов, вызывающих инфекционные заболевания желудочно-кишечного тракта, имеет решающее значение в организации микробиологического мониторинга в системе эпидемиологического надзора и профилактики инфекционных угроз в странах Африки. Сегодня Гвинея испытывает особую потребность в масштабных исследованиях, нацеленных на изучение этиологии ОКИ для создания региональной стратегии профилактики диарейных заболеваний, необходимой для сохранения здоровья жителей республики.

Цель работы — провести анализ этиологической структуры ОКИ в Гвинейской Республике.

Материалы и методы

В исследование были включены пациенты, обратившиеся в медицинские центры с признаками ОКИ (диарея, тошнота, рвота, боли в животе, симптомы общей интоксикации). Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов или их законных представителей. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (протокол № 27 от 02.07.2019).

Пробы испражнений 724 пациентов, из них детей в возрасте 1–5 лет — 73 (10,1%), в возрасте 6–17 лет — 130 (18,0%), взрослых 18–76 лет — 521 (72,0%), исследовали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией с двумя наборами реагентов:

1) «АмплиСенс ОКИ скрин-FL» для выявления и дифференциации ДНК (РНК) микроорганизмов рода *Shigella* spp./EIEC, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. (термофильных), *Adenovirus* (группы F), *Rotavirus* (группы A), *Norovirus* (2-го генотипа) и *Astrovirus*;

2) «АмплиСенс Эшерихиозы-FL» для выявления DEC 5 патогрупп: EPEC, EHEC, ETEC, EIEC, EAgEC (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия).

Тотальную ДНК/РНК выделяли с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп» (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). ПЦР проводили с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени (ПЦР-РВ) CXT-1000 («Bio-Rad»). Все процедуры выделения нуклеиновых кислот и ПЦР-РВ, использованные в данном исследовании, были проведены с применением соответствующих положительных, отрицательных и внутренних контрольных образцов, включённых в диагностические наборы. Использование контролей на всех этапах позволило подтвердить правильность и точность полученных результатов, исключить возможность ложноположительных или ложноотрицательных выводов.

В пробах испражнений, в которых был получен флуоресцентный сигнал присутствия *Shigella* spp./EIEC («АмплиСенс ОКИ скрин-FL») и EIEC («АмплиСенс Эшерихиозы-FL»), был проведён целенаправленный поиск штаммов *Shigella* spp. и EIEC. Культуральным методом с использованием

---

[1] Декларация тысячелетия Организации Объединенных Наций. URL: https://www.un.org/ru/documents/decl_conv/declarations/summitdecl.shtml

[2] ВОЗ. Диарея; 2024. URL: https://who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease WHO. Diarrhoeal disease; 2024. URL: https://who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease

[3] National Surveillance of Bacterial Foodborne Illness (Enteric Diseases).
URL: https://www.cdc.gov/nationalsurveillance/index.html;
Surveillance and disease data for *Escherichia coli.*
URL: https://www.ecdc.europa.eu/en/escherichia-coli-ecoli/surveillance-and-disease-data

селективных сред Эндо и Hektoen агар (ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии) были выделены *E. coli.*

Для оценки статистической значимости различий средних величин применяли точный критерий Фишера. Достоверность различий между изучаемыми показателями определяли в тесте Манна–Уитни. Значимыми считали различия при доверительном интервале 95% ($p \leq 0{,}05$).

Исследования проводили в лаборатории Российско-Гвинейского научно-исследовательского центра эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней в рамках научно-исследовательской работы «Изучение этиологической структуры и молекулярно-генетическая характеристика возбудителей диарейных заболеваний в Гвинейской Республике».

Результаты

По суммарным данным, в 2019–2022 гг. генетические маркеры вирусных и бактериальных возбудителей ОКИ были выявлены в пробах испражнений 479 (66,2%) обследованных лиц: у 238 (49,7%; 95% ДИ 45,2–54,2%) мужчин и 241 (50,3%; 95% ДИ 45,9–54,8%) женщин ($p > 0{,}05$). Чаще детерминанты искомых патогенов обнаруживали в возрастной группе пациентов 18 лет и старше — 331 (69,1%; 95% ДИ 64,8–73,1%; $p \leq 0{,}05$). Достоверных различий в частоте детекции ДНК/РНК возбудителей ОКИ в пробах детей раннего (n = 59; 12,3%; 95% ДИ 9,7–15,6%) и школьного (n = 89; 18,6%; 95% ДИ 15,5–22,3%) возрастов не выявлено (критерий Манна–Уитни). Достоверных различий ($p \leq 0{,}05$) в частоте детекции генетических маркеров ОКИ установленной этиологии в зависимости от пола и возраста по суммарным данным и отдельно по годам не выявлено (**рис. 1**).

В пробах 245 обследованных пациентов с диарейным синдромом генетические детерминанты указанных возбудителей не обнаружены, таким образом, на долю инфекций неясной этиологии в среднемноголетний период приходилось 33,8%.

Результаты молекулярного исследования отдельно по годам и по суммарным данным представлены в **табл. 1** и **табл. 2**. Во все годы наблюдения в этиологической структуре ОКИ значительно преобладали бактериальные патогены по сравнению с вирусными ($p \leq 0{,}05$).

ДНК возбудителей бактериальной природы выявлены в 355 (74,1%; 95% ДИ 70,1–77,8%) пробах, из них на долю *Campylobacter* spp. приходилось 9,8% (95% ДИ 7,5–12,9%), *Salmonella* spp. — 1,9% (95% ДИ 1,0–3,5%), DEC — 62,4% (95% ДИ 57,9–66,7%). На долю возбудителей вирусных инфекций приходилось 25,1% (95% ДИ 22,2–30,0%), из них *Adenovirus* — 10,2% (95% ДИ 7,8–13,3%), *Rotavirus* — 6,9% (95% ДИ 4,9–9,5%), *Norovirus* — 6,7% (95% ДИ 4,8–9,3%), *Astrovirus* — 2,1% (95% ДИ 1,1–3,8%).

Ведущими возбудителями во все годы наблюдения были DEC. В возрастной структуре значимо чаще они встречались у детей раннего возраста 0–5 лет (91,7%; 95% ДИ 82,7–96,9%; $p \leq 0{,}05$) по сравнению с группой детей школьного возраста 6–17 лет (53,9%; 95% ДИ 44,9–62,8%) и взрослыми (45,6%; 95% ДИ 41,3–50,0%). По суммарным данным выявлено значимое преобладание патогруппы EAgEC как в структуре эшерихиозов (46,8%; 95% ДИ 41,2–52,5%), так и в общей структуре ОКИ (29,3%; 95% ДИ 25,3–33,5%; $p \leq 0{,}05$). В среднемноголетней структуре эшерихиозов на долю других патогрупп DEC: EPEC, ETEC и EIEC, приходилось 20,1, 13,0 и 13,7% соответственно. Находки генетических детерминант STEC были реже по сравнению с другими патогруппами DEC, по суммарным данным их доля составляла 6,4%.

Генетические маркеры бактериальных патогенов при моно- и сочетанных инфекциях как во все годы мониторинга, так и суммарно в период проведённого исследования выявлялись значимо чаще по сравнению с возбудителями вирусной этиологии ($p \leq 0{,}05$).

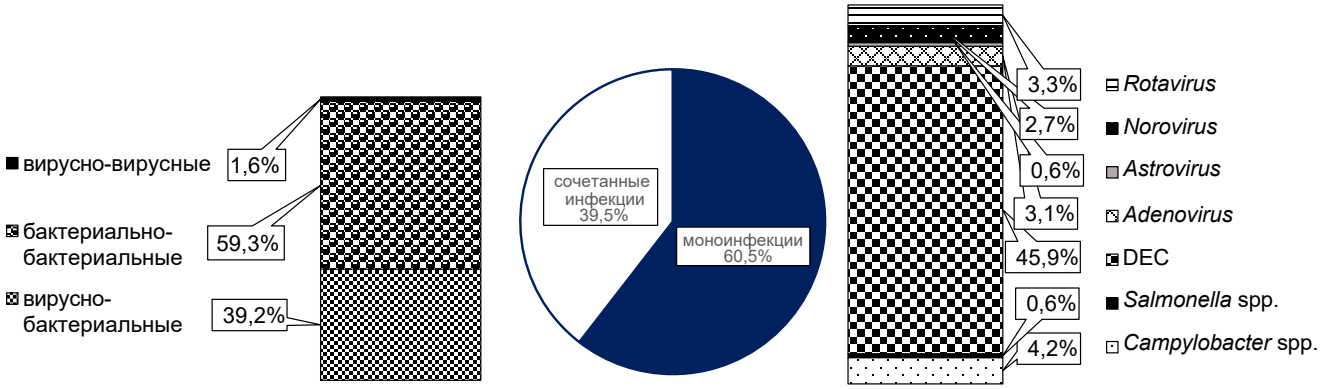


Рис. 1. Частота выделения генетических детерминант возбудителей ОКИ у жителей Гвинейской Республики в 2019–2022 гг.

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-722

Таблица 1. Частота выделения генетических детерминант возбудителей ОКИ у жителей Гвинейской Республики в 2019, 2020, 2021, 2022 гг.

Год	Возбудитель	Всего		Моноинфекция		Сочетанные инфекции	
		n	%	*n*	%	*n*	%
2019	**Бактериальные**						
	Campylobacter spp.	6	7,3	5	6,1	1	1,2
	Salmonella spp.	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	DEC	38	46,3	36	43,9	2	2,4
	Всего бактериальных	44	53,7	41	50,0	3	3,7
	Вирусные						
	Adenovirus	30	36,6	8	9,8	22	26,8
	Astrovirus	2	2,4	1	1,2	1	1,2
	Norovirus	3	3,7	2	2,4	1	1,2
	Rotavirus	3	3,7	2	2,4	1	1,2
	Всего вирусных	38	46,3	13	15,9	25	30,5
	Итого возбудителей ОКИ	82	100,0	54	65,9	28	34,1
2020	**Бактериальные**						
	Campylobacter spp.	6	5,1	1	0,8	5	4,2
	Salmonella spp.	6	5,1	1	0,8	5	4,2
	DEC	72	61,0	51	43,2	21	17,8
	Всего бактериальных	84	71,2	53	44,9	31	26,3
	Вирусные						
	Adenovirus	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	Astrovirus	2	1,7	2	1,7	0	0,0
	Norovirus	9	7,6	4	3,4	5	4,2
	Rotavirus	23	19,5	10	8,5	13	11,0
	Всего вирусных	34	28,8	16	13,6	18	15,3
	Итого возбудителей ОКИ	118	100	69	58,5	49	41,5
2021	**Бактериальные**						
	Campylobacter spp.	32	14,7	14	6,5	18	8,3
	Salmonella spp.	1	0,5	1	0,5	0	0
	DEC	142	65,4	98	45,2	44	20,3
	Всего бактериальных	175	80,6	113	52,1	62	28,6
	Вирусные						
	Adenovirus	19	8,8	7	3,2	12	5,5
	Astrovirus	2	0,9	0	0,0	2	0,9
	Norovirus	19	8,8	6	2,8	13	6,0
	Rotavirus	2	0,9	1	0,5	1	0,5
	Всего вирусных	42	19,4	14	6,5	28	12,9
	Итого возбудителей ОКИ	217	100	127	58,5	90	41,5
2022	**Бактериальные**						
	Campylobacter spp.	3	4,8	0	0,0	3	4,8
	Salmonella spp.	2	3,2	1	1,6	1	1,6
	DEC	47	75,8	35	56,5	12	19,4
	Всего бактериальных	52	83,9	36	58,1	16	30,8
	Вирусные						
	Adenovirus	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	Astrovirus	4	6,5	0	0,0	4	6,5
	Norovirus	1	1,6	1	1,6	0	0,0
	Rotavirus	5	8,1	3	4,8	2	3,2
	Всего вирусных	10	16,1	4	6,5	6	9,7
	Итого возбудителей ОКИ	62	100,0	40	64,5	22	35,5

Таблица 2. Частота выделения генетических детерминант возбудителей ОКИ от жителей Гвинейской Республики с диарейным синдромом в 2019–2022 гг.

Возбудитель	Всего		Моноинфекция		Сочетанные инфекции	
	n	%	*n*	%	*n*	%
Бактериальные						
Campylobacter spp.	47	9,8	20	4,2	27	5,6
Salmonella spp.	9	1,9	3	0,6	6	1,3
DEC, из них:	299	62,4	220	45,9	79	16,5
EAgEC	140	46,8	83	27,8	57	19,1
EPEC	60	20,1	35	19,7	6	0,3
ETEC	39	13,0	32	10,7	7	2,3
EIEC	41	13,7	59	11,7	1	2,0
STEC	19	6,4	11	3,7	8	2,7
Всего бактериальных	355	74,1	243	50,7	112	23,4
Вирусные						
Adenovirus	49	10,2	15	3,1	34	7,1
Astrovirus	10	2,1	3	0,6	7	1,5
Norovirus	32	6,7	13	2,7	19	4,0
Rotavirus	33	6,9	16	3,3	17	3,5
Всего вирусных	124	25,9	47	9,8	77	16,1
Итого возбудителей ОКИ	479	100,0	290	60,5	189	39,5

Моноинфекции, обусловленные одним видом возбудителя ОКИ, во все годы наблюдения превалировали над ОКИ сочетанной этиологии (**рис. 2**). В 290 (60,5%; 95% ДИ 56,1–64,8%) положительных пробах выявлены генетические маркеры одного возбудителя, из них DEC значимо чаще — 45,9% (95% ДИ 43,2–56,5%) по сравнению с другими возбудителями бактериальной природы (*Campylobacter* spp. — 4,2%; 95% ДИ 0–6,5%; *Salmonella* spp. — 0,6%; 95% ДИ 0–1,6%) и вирусной природы 47 (9,8%) (*Adenovirus* — 3,1%; 95% ДИ 0–9,8%; *Astrovirus* — 0,6%; 95% ДИ 0–1,7%; *Norovirus* — 2,7%; 95% ДИ

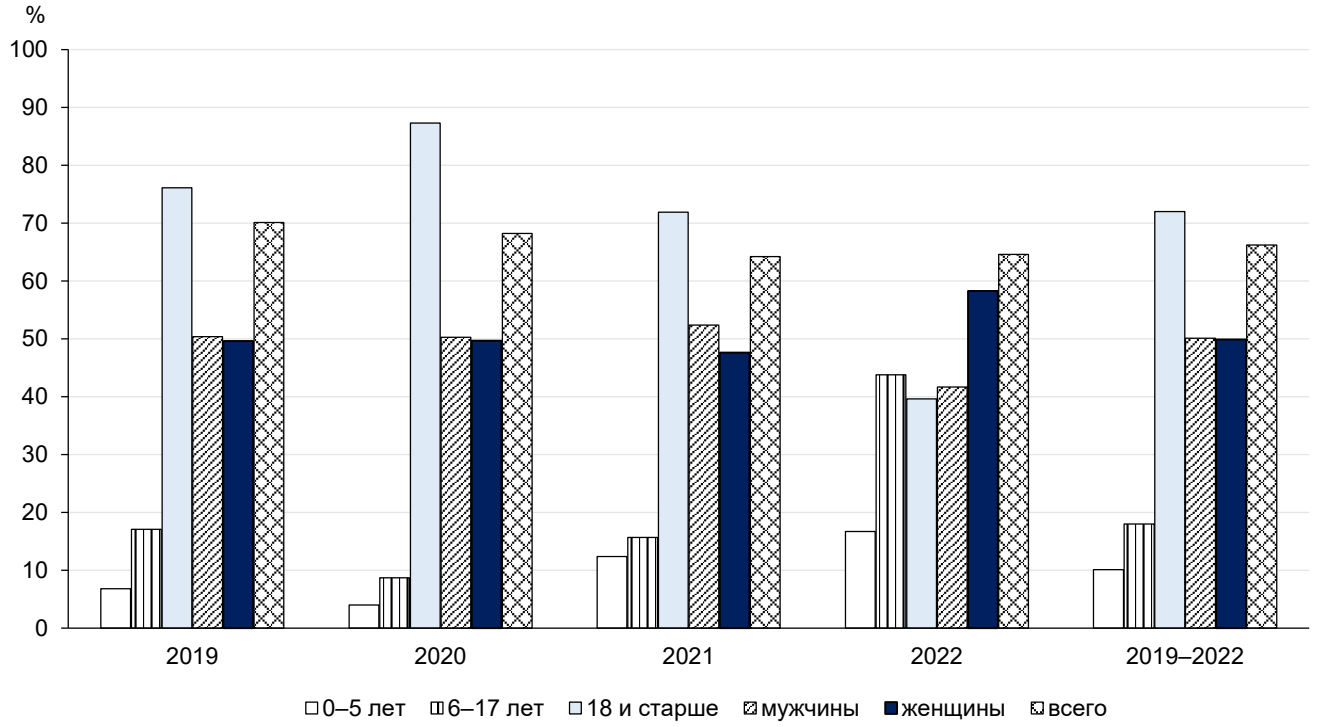


Рис. 2. Характеристика ОКИ в Гвинейской Республике в 2019–2020 гг.

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-722

1,6–3,4%; *Rotavirus* — 3,3%; 95% ДИ 0,5–8,5%). Анализ молекулярных исследований показал в 189 (39,5%; 95% ДИ 35,2–43,9%) пробах присутствие двух и более генетических маркеров исследуемых возбудителей ОКИ, из них вирусно-бактериальных — 74 (39,2%), бактериально-бактериальных — 112 (59,3%), вирусно-вирусных — 3 (1,6%).

Обсуждение

Диарейные заболевания детей и взрослых являются актуальной проблемой в Гвинейской Республике. Установлено, что основными возбудителями являются представители антропонозных инфекций — 363 (75,8%), из них на долю вирусной природы (*Adenovirus, Astrovirus, Norovirus, Rotavirus*) приходится 25,9% (95% ДИ 22,2–30,0%), на долю бактериальных (EAgEC, EPEC, ETEC, EIEC) — 58,5% (95% ДИ 54,0–62,8%). Полученные результаты подтверждают, что возбудители антропонозных инфекций преобладают в развивающихся странах по сравнению с возбудителями, передающимися, как правило, с пищевыми продуктами: *Salmonella*, *Campylobacter* и STEC в промышленно развитых странах [13–15]. Генетические маркеры бактерий рода *Salmonella* были выявлены в 9 (1,9%) случаях, рода *Campylobacter* — в 47 (9,8%), STEC — в 19 (6,4%). Это позволяет сделать предположение о том, что в рационе питания жителей Гвинеи (детей и взрослых) мясные и молочные продукты присутствуют в недостаточном количестве, однако этот вопрос нуждается в дальнейшем изучении.

В проведённом исследовании генетические детерминанты *Rotavirus* были выявлен только у 33 (6,9%) пациентов, несмотря на то что этот возбудитель является наиболее частой причиной тяжёлого гастроэнтерита у детей во многих экономически развитых странах, составляя 30–72% госпитализированных пациентов и 4–24% пациентов при остром гастроэнтерите лёгкой степени, не требующим госпитализации. Возможно, отсутствие этого возбудителя в этиологической структуре ОКИ связано с проведением вакцинации против ротавирусной инфекции [16].

Мониторинг позволил установить, что DEC были основной причиной ОКИ (62,4%). Использование молекулярных методов позволило оценить структуру эшерихиозов и установить циркуляцию всех известных патогрупп DEC на территории Гвинейской Республики. По суммарным данным, в структуре эшерихиозов во все годы наблюдения преобладали штаммы патогруппы EAgEC, на долю которых приходилось 46,8%. Исследования, проведённые в Латинской Америке, Азии, Африке и странах Восточной Европы, показали, что EAgEC чаще, чем другие бактериальные патогены, являются причиной диарей у детей [17–19]. Данные, полученные в США, Европе и Израиле, также свидетельствуют о том, что EAgEC часто вызывают диарейные заболевания у детей [20]. В США показатели заболеваемости эшерихиозами, обусловленными EAgEC, у детей раннего возраста выше, чем при кампилобактериозах и сальмонеллёзах [21].

В ходе эпидемиологических исследований в странах Западной Африки (Мали, Гамбия, Буркина-Фасо) обнаружено наличие DEC в питьевой воде колодцев и в расфасованных пакетах («water sachets», «пакетированная вода»), что указывает на возможность заражения человека этими микроорганизмами. Полученные результаты имеют важное значение для понимания эпидемиологии эшерихиозов и представляют интерес для изучения аналогичных проблем в соседних странах Африки, включая Гвинейскую Республику [18, 22].

В целом у 290 (60,5%) жителей Гвинейской Республики были выявлены генетические детерминанты одного возбудителя ОКИ, и по результатам лабораторного исследования была идентифицирована моноинфекция. У 189 (39,5%) обследованных установлена ассоциация энтеропатогенов (сочетанная ОКИ). Высокая распространённость сочетанных ОКИ (25–53%) описана в развивающихся странах [23, 24]. Во всех сочетанных инфекциях преобладали DEC, что согласуется с данными литературы [18, 19].

Использование комплексного мультиплексного формата при лабораторной диагностике ОКИ на сегодняшний день является единственным высокочувствительным методом, позволяющими установить этиологию ОКИ не только в остром периоде заболевания, но и при бессимптомном бактерионосительстве. Широкомасштабное исследование, проведённое в Эфиопии с использованием современных методов лабораторной диагностики, показало, что в 56,3% случаях диарейный синдром обусловлен возбудителями ОКИ бактериальной, вирусной и/или паразитарной природы и, что немаловажно, позволило выявить сочетанные инфекции в 35% случаев [25–27].

Проведённое исследование подтвердило актуальность DEC для населения Гвинейской Республики, как и для других стран Африки [2, 3, 7, 9, 18]. Лабораторная диагностика этих возбудителей возможна только с использованием молекулярно-генетических методов [28].

Заключение

Этиология возбудителей ОКИ у жителей Гвинейской Республики включает бактериальные и вирусные возбудители. Проведённое исследование показало, что практически у каждого второго пациента причиной диарейного заболевания являлись DEC, что подтвердило их актуальность в структуре ОКИ. Для снижения бремени диарейных заболеваний в Гвинее необходимо проведение целенаправленных эпидемиологических и микробиологических иссле-

дований по выявлению DEC, изучению контаминации объектов окружающей среды, в том числе воды и пищевых продуктов, определению факторов риска. Учитывая тот факт, что диарея — это полиэтиологичное заболевание, необходимо внедрять комплексный, быстрый, надёжный и доступный метод идентификации широкого спектра возбудителей.

Впервые детально выполненный анализ этиологической структуры ОКИ в Гвинейской Республике создаёт основу для разработки научно обоснованной политики профилактики и лечения инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта. Подобные исследования позволят реагировать на новые угрозы, снизить заболеваемость и эффективнее использовать ресурсы здравоохранения. Для успешного предупреждения диарейных инфекций необходимы такие меры, как анализ путей передачи возбудителей, обеспечение качественной питьевой водой, повышение уровня санитарной грамотности населения, создание системы эпидемиологического мониторинга. Внедрение ПЦР-диагностики в рутинную медицинскую практику Республики Гвинея станет значительным вкладом в улучшение здоровья населения и сокращение заболеваемости инфекционными заболеваниями желудочно-кишечного тракта.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Hartman R.M., Cohen A.L., Antoni S., et al. Risk factors for mortality among children younger than age 5 years with severe diarrhea in low- and middle-income countries: findings from the World Health Organization-coordinated Global Rotavirus and Pediatric Diarrhea Surveillance Networks. *Clin. Infect. Dis*. 2023;76(3):e1047–53.
DOI: https://doi.org/10.1093/cid/ciac561
2. Kalule J.B., Bester L.A., Banda D.L., et al. Molecular epidemiology and AMR perspective of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in Africa: a systematic review and meta-analysis. *J. Epidemiol. Glob. Health*. 2024;14(4):1381–96.
DOI: https://doi.org/10.1007/s44197-024-00301-w
3. Manhique-Coutinho L., Chiani P., Michelacci V., et al. Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolates from children with diarrhea: a cross-sectional study in four provinces of Mozambique: diarrheagenic *Escherichia coli* in Mozambique. *Int. J. Infect. Dis*. 2022;121:190–4.
DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.04.054
4. Vorlasane L., Luu M.N., Tiwari R., et al. The clinical characteristics, etiologic pathogens and the risk factors associated with dehydration status among under-five children hospitalized with acute diarrhea in Savannakhet Province, Lao PDR. *PLoS One*. 2023;18(3):e0281650.
DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281650
5. Khairy R.M.M., Fathy Z.A., Mahrous D.M., et al. Prevalence, phylogeny, and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* pathotypes isolated from children less than 5 years old with community acquired- diarrhea in Upper Egypt. *BMC Infect. Dis.* 2020;20(1):908.
DOI: https://doi.org/10.1186/s12879-020-05664-6
6. Tang X., Oyetoran A., Jones T., Bray C. Aeromonas caviae-associated severe bloody diarrhea. *Case Rep. Gastrointest. Med*. 2023;2023:4966879.
DOI: https://doi.org/10.1155/2023/4966879
7. Wolde D., Tilahun G.A., Kotiso K.S., et al. The Burden of diarrheal diseases and its associated factors among under-five children in Welkite Town: a community based cross-sectional study. *Int. J. Public Health*. 2022;67:1604960.
DOI: https://doi.org/10.3389/ijph.2022.1604960
8. Kemajou D.N. Climate variability, water supply, sanitation and diarrhea among children under five in Sub-Saharan Africa: a multilevel analysis. *J. Water Health*. 2022;20(4):589–600.
DOI: https://doi.org/10.2166/wh.2022.199
9. Grenov B., Lanyero B., Nabukeera-Barungi N., et al. Diarrhea, dehydration, and the associated mortality in children with complicated severe acute malnutrition: a prospective cohort study in Uganda. *J. Pediatr*. 2019;210:26–33.e3.
DOI: https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2019.03.014
10. Adane M., Mengistie B., Medhin G., et al. Piped water supply interruptions and acute diarrhea among under-five children in Addis Ababa slums, Ethiopia: a matched case-control study. *PLoS One*. 2017;12(7):e0181516.
DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181516
11. Gavhi F., Kuonza L., Musekiwa A., Motaze N.V. Factors associated with mortality in children under five years old hospitalized for severe acute malnutrition in Limpopo province, South Africa, 2014–2018: a cross-sectional analytic study. *PLoS One*. 2020;15(5):e0232838.
DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232838
12. Ellis S.J., Crossman L.C., McGrath C.J., et al. Identification and characterisation of enteroaggregative *Escherichia coli* subtypes associated with human disease. *Sci. Rep*. 2020;10(1):7475.
DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-020-64424-3
13. Getahun W., Adane M. Prevalence of acute diarrhea and water, sanitation, and hygiene (WASH) associated factors among children under five in Woldia Town, Amhara Region, northeastern Ethiopia. *BMC Pediatr*. 2021;21(1):227.
DOI: https://doi.org/10.1186/s12887-021-02668-2
14. Hlashwayo D.F., Sigaúque B., Noormahomed E.V., et al. A systematic review and meta-analysis reveal that *Campylobacter* spp. and antibiotic resistance are widespread in humans in sub-Saharan Africa. *PLoS One*. 2021;16(1):e0245951.
DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245951
15. Kotloff K.L. Bacterial diarrhoea. *Curr. Opin. Pediatr*. 2022;34(2):147–55.
DOI: https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000001107
16. GBD 2019 Under-5 Mortality Collaborators. Global, regional, and national progress towards Sustainable Development Goal 3.2 for neonatal and child health: all-cause and cause-specific mortality findings from the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*. 2021;398(10303):870–905.
DOI: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01207-1
17. Boisen N., Østerlund M.T., Joensen K.G., et al. Redefining enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): genomic characterization of epidemiological EAEC strains. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2020;14(9):e0008613.
DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008613
18. Ochieng J.B., Powell H., Sugerman C.E., et al. Epidemiology of enteroaggregative, enteropathogenic, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* among children aged <5 years in 3 countries in Africa, 2015–2018: Vaccine Impact on Diarrhea in Africa (VIDA) study. *Clin. Infect. Dis*. 2023;76(76 Suppl. 1): S77–86.
DOI: https://doi.org/10.1093/cid/ciad035
19. Modgil V., Mahindroo J., Narayan C., et al. Comparative analysis of virulence determinants, phylogroups, and antibiotic susceptibility patterns of typical versus atypical enteroaggregative *E. coli* in India. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2020;14(11):e0008769.
DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008769
20. Van Nederveen V., Melton-Celsa A.R. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC). *EcoSal Plus*. 2025;eesp00112024.
DOI: https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0011-2024

21. Wikswo M.E., Roberts V., Marsh Z., et al. Enteric illness outbreaks reported through the national outbreak reporting system — United States, 2009–2019. *Clin. Infect. Dis*. 2022;74(11):1906–13. DOI: https://doi.org/10.1093/cid/ciab771
22. Bonkoungou I.J.O., Somda N.S., Traoré O., et al. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* in human diarrheic stool and drinking water samples in Ouagadougou, Burkina Faso. *Afr. J. Infect. Dis*. 2020;15(1):53–8. DOI: https://doi.org/10.21010/ajid.v15i1.7
23. Poeta M., Del Bene M., Lo Vecchio A., Guarino A. Acute infectious diarrhea. *Adv. Exp. Med. Biol*. 2024;1449:143–56. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-031-58572-2_9
24. Meisenheimer E.S., Epstein C.D.O., Thiel D. Acute diarrhea in adults. *Am. Fam. Physician*. 2022;106(1):72–80.
25. Lääveri T., Antikainen J., Mero S., et al. Bacterial, viral and parasitic pathogens analysed by qPCR: findings from a prospective study of travellers' diarrhoea. *Travel Med. Infect. Dis*. 2021;40:101957. DOI: https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2020.101957
26. Çimen B., Aktaş O. Distribution of bacterial, viral and parasitic gastroenteritis agents in children under 18 years of age in Erzurum, Turkey, 2010–2020. *Germs*. 2022;12(4):444–51. DOI: https://doi.org/10.18683/germs.2022.1350
27. Bhat A., Rao S.S., Bhat S., et al. Molecular diagnosis of bacterial and viral diarrhoea using multiplex-PCR assays: an observational prospective study among paediatric patients from India. *Indian J. Med. Microbiol*. 2023;41:64–70. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijmmb.2023.01.002
28. Макарова М.А. Современное представление о диареегенных *Escherichia coli* — возбудителях острых кишечных инфекций. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(4):333–44. Makarova M.A. A modern view of diarrheagenic *Escherichia coli* – a causative agent of acute intestinal infections. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2023;100(4):333–44. DOI: https://doi.org/https://doi.org/10.36233/0372-9311-410 EDN: https://elibrary.ru/rnmhnb

Информация об авторах

Макарова Мария Александровна✉ — д-р мед. наук, доцент, в. н. с., зав. лаб. кишечных инфекций Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия; профессор каф. медицинской микробиологии Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия, makmaria@mail.ru, https://orcid.org/0000-0003-3600-2377

Бальдэ Раматулай — н. с. отдела бактериологии НИИ прикладной биологии Гвинеи, Киндия, Гвинея, balderamatoulaye025@gmail.com, https://orcid.org/0009-0005-7945-3807

Кафтырева Лидия Алексеевна — д-р мед. наук, зав. микробиологическим отделом Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия; профессор каф. медицинской микробиологии Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия, kaflidia@mail.ru, https://orcid.org/0000-0003-0989-1404

Матвеева Зоя Николаевна — канд. мед. наук, в. н. с. лаб. кишечных инфекций Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, z_matveeva56@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-7173-2255

Жамборова Самида Хасанбиевна — м. н. с. лаб. кишечных инфекций Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, zhamborova.m@mail.ru, https://orcid.org/0009-0009-9620-9784

Участие авторов: *Макарова М.А.* — методология и дизайн исследования, анализ полученных данных, проведение исследований, написание и редактирование рукописи; *Бальдэ Р.* — организация и проведение исследований, обработка материала, интерпретация и анализ полученных данных; *Кафтырева Л.А.* — методология и дизайн исследования, редактирование рукописи; *Матвеева З.Н.* — редактирование рукописи; *Жамборова С.Х.* — проведение исследования, интерпретация 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 08.06.2025;
принята к публикации 15.08.2025;
опубликована 28.08.2025

Information about the authors

Maria A. Makarova✉ — Dr. Sci. (Med.), Assistant Professor, senior researcher, Head, Laboratory of enteric infection, St. Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia; Professor, Department of medical microbiology, I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russia, makmaria@mail.ru, https://orcid.org/0000-0003-3600-2377

Ramatoulay Balde — researcher, Department of bacteriology, Research Institute of Applied Biology of Guinea, Kindia, Republic of Guinea, balderamatoulaye025@gmail.com, https://orcid.org/0009-0005-7945-3807

Lidiya A. Kaftyreva — Dr. Sci. (Med.), Head, Microbiological department, St. Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia; Professor, Department of medical microbiology, I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russia, kaflidia@mail.ru, https://orcid.org/0000-0003-0989-1404

Zoya N. Matveeva — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of enteric infection, St. Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, z_matveeva56@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-7173-2255

Samida Kh. Zhamborova — researcher, Laboratory of enteric infection, St. Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, zhamborova.m@mail, https://orcid.org/0009-0009-9620-9784

Authors' contribution: *Makarova M.A.* — methodology and design of research, analysis of the data obtained, conducting research, writing and editing the manuscript; *Balde R.* — organization and conduct of research, interpretation and analysis of the data obtained; *Kaftyreva L.A.* — methodology and design of research, editing the manuscript; *Matveeva Z.N.* — editing the manuscript; *Zhamborova S.H.* — conducting research, interpreting 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 08.06.2025;
accepted for publication 15.08.2025;
published 28.08.2025

Оригинальное исследование
https://doi.org/10.36233/0372-9311-660

Резистентность к антимикробным препаратам штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных у детей на фоне иммунизации 13-валентной конъюгированной вакциной

Протасова И.Н.[1]✉, Фельдблюм И.В.[2], Бахарева Н.В.[3], Зиновьева Л.В.[4], Кулик Е.В.[5]

[1]Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, Россия;
[2]Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера, Пермь, Россия;
[3]Красноярский краевой центр профилактики и борьбы со СПИД, Красноярск, Россия;
[4]Красноярская городская детская больница № 8, Красноярск, Россия;
[5]Красноярская городская детская поликлиника № 2, Красноярск, Россия

Аннотация

Введение. Мониторинг резистентности *Streptococcus pneumoniae* к антимикробным препаратам (АМП) является важным компонентом эпидемиологического надзора за пневмококковой инфекцией, решающим задачи по совершенствованию терапевтических подходов и сдерживанию распространения резистентности на региональном и национальном уровнях.

Цель работы — исследование антибиотикорезистентности пневмококков у детей дошкольного возраста на фоне применения 13-валентной конъюгированной вакцины в рамках национального календаря профилактических прививок.

Материалы и методы. В 2016–2022 гг. обследовано 1250 здоровых детей в возрасте до 6 лет из организованных коллективов. Выявление назофарингеального носительства пневмококка проводили культуральным методом, серотип определяли посредством полимеразной цепной реакции. Чувствительность к АМП исследовали диско-диффузионным методом, минимальную подавляющую концентрацию антибиотиков у резистентных изолятов определяли с помощью Е-тестов.

Результаты. Исследовано 265 изолятов *S. pneumoniae,* резистентность к АМП обнаружена у 36,6%. Доля резистентных изолятов составила 33,8% в раннем поствакцинальном периоде (2016–2018 гг.) и 45,3% — в позднем (2020–2022 гг.) (p = 0,097). Пенициллинрезистентные пневмококки выявлены только в раннем поствакцинальном периоде с частотой 11,4% (p = 0,005). Распространённость изолятов, устойчивых к макролидам, в анализируемых периодах составила 27,9 и 35,9% (p = 0,219), устойчивых одновременно к 3 и более классам АМП — 23,4 и 17,2% соответственно (p = 0,297). Серотиповой состав резистентных *S. pneumoniae* изменился: вакцинные сероварианты 19F, 6A, 6B и др. (83,8%) сменились невакцинными — 15AF, 23A и др. Доля вакцинных серотипов в позднем поствакцинальном периоде составила лишь 10,3%.

Заключение. На фоне иммунизации детей против пневмококковой инфекции наблюдается уменьшение распространённости пневмококков со сниженной чувствительностью к β-лактамам. Устойчивость *S. pneumoniae* к макролидам остаётся на высоком уровне (35,9%). Резистентные изоляты пневмококка в основном относятся к серогруппе 15 (15AF) и серотипу 23A, не входящим в состав 13-валентной конъюгированной вакцины.

Ключевые слова: *Streptococcus pneumoniae, резистентность, серотипы, дети-бактерионосители*

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов или их законных представителей. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (протокол № 69/2016 от 28.04.2016) и Независимым междисциплинарным Комитетом по этической экспертизе клинических исследований (протокол № 1 от 17.01.2020).

Источник финансирования. Финансирование в части обследования детей из организованных коллективов и серотипирования выделенных культур *S. pneumoniae* осуществлялось в рамках многоцентрового международного проспективного эпидемиологического исследования особенностей пневмококковой инфекции «SAPIENS» (2016–2018 и 2020–2022 гг.), спонсором которого являлся благотворительный фонд Ростроповича–Вишневской «Во имя здоровья и будущего детей».

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

Для цитирования: Протасова И.Н., Фельдблюм И.В., Бахарева Н.В., Зиновьева Л.В., Кулик Е.В. Резистентность к антимикробным препаратам штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных у детей на фоне иммунизации 13-валентной конъюгированной вакциной. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2025;102(4):445–455.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-660
EDN: https://www.elibrary.ru/UILZON

© Протасова И.Н., Фельдблюм И.В., Бахарева Н.В., Зиновьева Л.В., Кулик Е.В., 2025

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-660

Original Study Article
https://doi.org/10.36233/0372-9311-660

Antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from children following immunization with a 13-valent conjugated vaccine

Irina N. Protasova[1]✉, Irina V. Feldblium[2], Natalya V. Bakhareva[3], Ludmila V. Zinovieva[4], Elena V. Kulik[5]

[1]Professor V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russia;
[2]Perm State Medical University named after Academician E.A. Wagner, Perm, Russia;
[3]Krasnoyarsk Regional Center for Prevention and Control of AIDS, Krasnoyarsk, Russia;
[4]Krasnoyarsk City Children's Hospital No. 8, Krasnoyarsk, Russia;
[5]Krasnoyarsk City Children's Clinic No. 2, Krasnoyarsk, Russia

Abstract

Introduction. Monitoring the resistance of *Streptococcus pneumoniae* to antimicrobials is an important component of epidemiological surveillance of pneumococcal infection, addressing the challenges of improving therapeutic approaches and containing the spread of resistance at regional and national levels.

The aim of the study is to investigate pneumococcal antibiotic resistance in preschool children following immunization with a 13-valent conjugated vaccine within the national immunization schedule.

Materials and methods. From 2016 to 2022, 1250 healthy children under the age of 6 from organized groups were examined. Detection of nasopharyngeal carriage of pneumococcus was performed using the culture method, and serotype was determined by polymerase chain reaction. Antimicrobial susceptibility was investigated using the disk diffusion method, and the minimum inhibitory concentration of antibiotics in resistant isolates was determined using E-tests.

Results. 265 isolates of *S. pneumoniae* were studied, and resistance to antimicrobials was found in 36.6%. The proportion of resistant isolates was 33.8% in the early post-vaccination period (2016–2018) and 45.3% in the late period (2020–2022) (p = 0.097). Penicillin-resistant pneumococci were detected only in the early post-vaccination period, with a frequency of 11.4% (p = 0.005). The prevalence of macrolide-resistant isolates in the analyzed periods was 27.9% and 35.9% (p = 0.219), and those resistant to 3 or more classes of antibiotics were 23.4% and 17.2%, respectively (p = 0.297). The serotype composition of resistant *S. pneumoniae* has changed: vaccine serotypes 19F, 6A, 6B, etc. (83.8%) have been replaced by non-vaccine serotypes – 15AF, 23A, etc. The proportion of vaccine serotypes in the late post-vaccination period was only 10.3%.

Conclusion. Against the backdrop of child immunization against pneumococcal infection, there has been a decrease in the prevalence of pneumococci with reduced susceptibility to β-lactams. *S. pneumoniae* resistance to macrolides remains high (35.9%). Resistant pneumococcal isolates primarily belong to serogroup 15 (15AF) and serotype 23A, which are not included in the 13-valent conjugate vaccine.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae, resistance, serotypes, asymptomatic carriers*

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The study was approved by the Ethics Committee of Professor V.F. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University (protocol No. 69, April 28, 2016) and the Independent Interdisciplinary Committee for Ethical Review of Clinical Trials (Protocol No. 1, January 17, 2020).

Funding source. Funding for the examination of children from organized groups and serotyping of *S. pneumoniae* isolates was provided within the framework of the multicenter international prospective epidemiological study of the characteristics of pneumococcal infection "SAPIENS" (2016–2018 and 2020–2022) sponsored by the Rostropovich–Vishnevskaya Foundation "For the Health of Children".

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

For citation: Protasova I.N., Feldblium I.V., Bakhareva N.V., Zinovieva L.V., Kulik E.V. Antimicrobial resistance of Streptococcus pneumoniae strains isolated from children following immunization with a 13-valent conjugated vaccine. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2025;102(4):445–455.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-660
EDN: https://www.elibrary.ru/UILZON

© Protasova I.N., Feldblium I.V., Bakhareva N.V., Zinovieva L.V., Kulik E.V., 2025

Введение

Streptococcus pneumoniae — условно-патогенный микроорганизм, часто колонизирующий верхние дыхательные пути и являющийся возбудителем широкого круга заболеваний, включая отиты, синуситы, гнойный бактериальный менингит и внебольничную пневмонию. В течение последних двух десятилетий вакцинопрофилактика пневмококковой инфекции (ПИ) проводится во многих странах в рамках национальных программ [1–4]. В России иммунизация детей и взрослых из групп риска инфицирования проводится с 2014 г. в соответствии с национальным календарем профилактических прививок [5]. В условиях проводимой специфической профилактики ПИ исследовательский интерес вызывают не только изменения серотипового и клонального пейзажей микробной популяции, происходящие под влиянием конъюгированных вакцин, но и динамика резистентности *S. pneumoniae* к антимикробным препаратам (АМП).

Устойчивость пневмококков к антибиотикам характеризуется тенденцией к росту и во многих странах расценивается как серьёзная угроза общественному здоровью и здравоохранению [6]. Макролидрезистентные пневмококки в настоящее время входят в список приоритетных бактериальных патогенов Всемирной организации здравоохранения (средний уровень приоритетности)[1]. Ранее в данный список были включены *S. pneumoniae*, не чувствительные к пенициллину[2].

Внедрение пневмококковых конъюгированных вакцин (ПКВ) в программы рутинной иммунизации детей привело во многих странах к снижению удельного веса инфекций, вызванных резистентными пневмококками. Это произошло за счёт частичной или полной элиминации серотипов *S. pneumoniae,* относящихся к «вакцинным» [1, 4–6]. Однако в дальнейшем, на фоне происходящего «замещения серотипов», в ряде стран отмечено повышение доли резистентных пневмококков, относящихся к «невакцинным» вариантам возбудителя. Резко увеличилась распространённость изолятов, резистентных к макролидам, тетрациклину, а в некоторых странах и к пенициллину [6–8]. При этом серотиповой пейзаж и распространённость резистентных сероварианторов *S. pneumoniae* значительно различаются не только между континентами и странами, но и в пределах одной страны, в зависимости от показателей привитости, уровня потребления АМП и других факторов [7]. В связи с этим динамическая оценка серотипового пейзажа и резистентности *S. pneumoniae* к АМП, проводимая как в «раннем», так и в «позднем» поствакцинальном периоде, является одной из важнейших составляющих эпидемиологического надзора за ПИ как основа для определения стратегии и тактики специфической профилактики и эмпирической терапии пневмококковых заболеваний [9]. Особенно важным проведение микробиологического мониторинга является в возрастной группе детей дошкольного возраста, где носительство *S. pneumoniae* встречается с частотой 24,4–54,3% [10–12], а уровень, структура резистентности и её молекулярные механизмы в настоящее время изучены недостаточно.

Исходя из вышеизложенного, **целью** нашего исследования явился сравнительный анализ структуры и механизмов резистентности пневмококков к АМП в динамике — в раннем (2016–2018 гг.) и позднем (2020–2022 гг.) поствакцинальных периодах у детей дошкольного возраста.

Материалы и методы

Обследовано 1250 здоровых детей из организованных детских коллективов Красноярска. Критериями включения явились постоянное посещение ребёнком детского организованного коллектива (детского сада), возраст 0–6 лет включительно, наличие информированного согласия, подписанного родителем или законным представителем, отсутствие признаков инфекционных заболеваний на момент обследования; критерием исключения явилось наличие признаков острого инфекционного заболевания на момент обследования. Состояние привитости оценивали по данным медицинской документации (форма № 112/у).

Средний возраст обследованных детей составил 4,12 ± 0,97 года. Из числа обследованных в 2016–2018 гг. получили законченный курс иммунизации (трехкратно, согласно национальному календарю) лишь 1,9% детей, были привиты частично (получили 1 или 2 дозы вакцины) 33,9%, оказались не привиты 64,2%. Из числа обследованных в 2020–2022 гг. получившие полный курс иммунизации составили уже 68,8%, получившие 1 или 2 дозы вакцины — 26,4%, не привитые против ПИ составили 4,8%.

У всех детей, включённых в исследование, однократно забирали назофарингеальные мазки с помощью зонд-тампонов с жидкой транспортной средой Эймса. Во всех случаях было получено информированное согласие родителей или законных представителей детей, включённых в исследование. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (протокол № 69/2016 от 28.04.2016) и Независимым

[1] WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. Geneva;2024. URL: https://who.int/publications/i/item/9789240093461

[2] WHO. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. Geneva;2017. URL: https://who.int/publications/i/item/WHO-EMP-IAU-2017.12

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-660

междисциплинарным Комитетом по этической экспертизе клинических исследований (протокол № 1 от 17.01.2020).

Культивирование *S. pneumoniae* проводили на колумбийском агаре с добавлением бараньей крови (5%), налидиксовой кислоты и колистина (готовый агар производства ООО «Средофф») в капнофильных условиях с использованием газогенераторных пакетов «Кампилогаз». Идентификацию пневмококков проводили на основании культуральных свойств, тестов с оптохином и желчью, а также ПЦР-детекции генов *cpsA* и *lytA*[3]. Определение серотипа осуществляли с помощью мультиплексной ПЦР[4]. Криоконсервацию выделенных культур осуществляли с использованием «Cryoinstant mix colores» («Deltalab»), хранение при –80ºС.

При определении чувствительности изолятов к АМП тестировали полученные культуры *S. pneumoniae* с 8 препаратами: оксациллином (1 мкг), эритромицином (15 мкг), клиндамицином (2 мкг), тетрациклином (30 мкг), норфлоксацином (10 мкг), ванкомицином (5 мкг), линезолидом (10 мкг) и рифампицином (5 мкг) диско-диффузионным методом на агаре Мюллера–Хинтона 2 («bioMerieux») с добавлением 5% дефибринированной крови лошади и 20 мг/л β-никотинамидадениндинуклеотида. Использовали диски «Bio-Rad». В качестве контроля использовали штамм *S. pneumoniae* ATCC 49619. Интерпретацию результатов проводили в соответствии с российскими рекомендациями «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (версия 2025 г.).

Для исключения механизмов резистентности к β-лактамам использовали скрининг с диском оксациллина 1 мкг. При выявлении зоны задержки роста вокруг диска с оксациллином более 20 мм изолят считали чувствительным ко всем β-лактамам. В случае, если диаметр зоны составил менее 20 мм, изолят считали резистентным к феноксиметилпенициллину. Диаметр зоны 9–19 мм свидетельствовал о чувствительности к ампициллину, амоксициллину, пиперациллину, цефепиму, цефотаксиму, цефтаролину, цефтобипролу, цефтриаксону, имипенему и меропенему. При диаметре зоны задержки роста менее 9 мм требовалось определение минимальной подавляющей концентрации (МПК) всех β-лактамных антибиотиков. Соответственно, определение МПК бензилпенициллина проводили у всех изолятов с диаметром зоны задержки роста менее 20 мм, а у культур с диаметром зоны менее 9 мм проводилось также определение МПК амоксициллина, цефтриаксона и имипенема. Использовали Е-тесты («bioMerieux»)[5]. Резистентными к пенициллину и амоксициллину считали изоляты с МПК более 1 мг/л, к цефтриаксону и имипенему — более 2 мг/л (согласно критериям для инфекций, кроме эндокардита и менингита).

Диск с эритромицином (15 мкг) использовали для скрининга резистентности к макролидам: чувствительные к нему изоляты учитывали как чувствительные к азитромицину, кларитромицину и рокситромицину. Изоляты, устойчивые к эритромицину, расценивали как макролидрезистентные. Для выявления индуцибельной резистентности к клиндамицину диски с эритромицином и клиндамицином помещали на расстоянии 12–16 мм друг от друга, результат оценивали как положительный при наличии D-образной зоны задержки роста тестируемой культуры.

Пневмококки, чувствительные к тетрациклину, расценивали как чувствительные к доксициклину и миноциклину; при выявлении тетрациклинрезистентности соответственно как резистентные к указанным АМП.

Диско-диффузионный тест с 10 мкг норфлоксацина использовали для скрининга резистентности к фторхинолонам. Чувствительные к норфлоксацину изоляты *S. pneumoniae* расценивали как чувствительные к моксифлоксацину и как чувствительные при повышенной экспозиции к левофлоксацину.

При выявлении у изолята устойчивости к АМП фенотипическими методами проводили выявление генов резистентности. Изоляты пневмококка, демонстрирующие устойчивость к эритромицину, тестировали на наличие генов *ermB* и *mef*, ответственных за резистентность к макролидам, линкозамидам и стрептограмину B в соответствии с методикой R.R. Reinert и соавт. [13]. У изолятов, устойчивых к тетрациклину, выявляли ген *tetM* [14]. При уровне МПК бензилпенициллина, превышающем 0,064 мг/л, изоляты *S. pneumoniae* тестировали на наличие мутаций в генах, кодирующих пенициллинсвязывающие белки (ПСБ): *pbp1a*, *pbp2x* и *pbp2b* [15].

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли при помощи пакета программ «Statistica v. 10.0.1011». Качественные признаки рассчитывали в виде долей (%), количественные — в виде средних значений и стандартных отклонений. Характер распределения признаков оценивали с использованием критерия Шапиро–Уилка. В случае подтверждения нормальности распределения для

[3] Лабораторная диагностика внебольничной пневмонии пневмококковой этиологии: Методические рекомендации МР 4.2.0114-16. М.; 2017. 64 с.

[4] Centers for Disease Control and Prevention. Streptococcus pneumoniae detection and serotyping using PCR. URL: https://www.cdc.gov/strep-lab/php/pneumococcus/serotyping-using-pcr.html?CDC_AAref_Val=https://www.cdc.gov/streplab/pneumococcus/resources.html (дата обращения 22.02.2025).

[5] Biomérieux. Etest. Тестирование антимикробной чувствительности. URL: https://omb.ru/upload/iblock/4c4/e_test_amoxicillinclavulanic_acid_21_xl_amoksitsillinklavulanovaya_kislota_256.pdf (дата обращения 22.02.2025).

сравнения групп использовали t-критерий Стьюдента, при отсутствии нормальности — критерий Манна–Уитни (при сравнении количественных признаков) или χ^2 (при сравнении качественных признаков). Уровнем статистической значимости различий во всех случаях считали $p < 0,05$.

Результаты

В процессе исследования было получено 265 изолятов пневмококка. При этом в период с 2016 по 2018 г. резистентность к одному и более АМП выявлена у 33,8% выделенных изолятов *S. pneumoniae* (у 68 из 201), в период с 2020 по 2022 г. — у 45,3% (у 29 из 64). Доля пневмококков, устойчивых к антибиотикам, за 7 лет увеличилась на 11,5% ($\chi^2 = 2,76$; $p = 0,097$).

Большинство резистентных изолятов, полученных в раннем поствакцинальном периоде, были выделены от детей, не привитых против ПИ, в то время как в позднем поствакцинальном периоде большая часть культур *S. pneumoniae* была выделена от полностью привитых детей (**табл. 1**).

В течение всего анализируемого периода (2016–2022 гг.) получено 83 изолята с диаметром зоны задержки роста вокруг диска с оксациллином менее 20 мм, из них у 34,9% диаметр составил 9–19 мм. Диапазон МПК бензилпенициллина у данных пневмококков составил 0,016–0,750 мг/л при уровне $МПК_{50}$ = 0,064 мг/л и $МПК_{90}$ = 0,19 мг/л. У изолятов с диаметром зоны задержки роста 0–8 мм (n = 54; 65,1%) $МПК_{50}$ бензилпенициллина составила 1 мг/л, $МПК_{90}$ — 2 мг/л при диапазоне МПК 0,094–8 мг/л. Таким образом, доля изолятов, резистентных к пенициллину (согласно критериям для инфекций, кроме эндокардита и менингита), за анализируемый период составила 8,7% (23 из 265); чувствительных при увеличенной экспозиции — 15,5% (41 из 265) (**рис. 1, 2**).

При генотипировании культур *S. pneumoniae*, резистентных и чувствительных при увеличенной

Таблица 1. Структура резистентных носоглоточных изолятов *S. pneumoniae* в зависимости от состояния привитости обследованных детей

Изоляты	Ранний поствакцинальный период (2016–2018 гг.; n = 68)	Поздний поствакцинальный период (2020–2022 гг.; n = 29)	Достоверность различий
От детей, привитых полностью, n (%)	5 (7,35)	22 (75,86)	$\chi^2 = 47,50$; $p = 0,000$
От детей, привитых частично, n (%)	10 (14,71)	4 (13,79)	$\chi^2 = 0,01$; $p = 0,907$
От непривитых детей, n (%)	53 (77,94)	3 (10,34)	$\chi^2 = 34,55$; $p = 0,000$

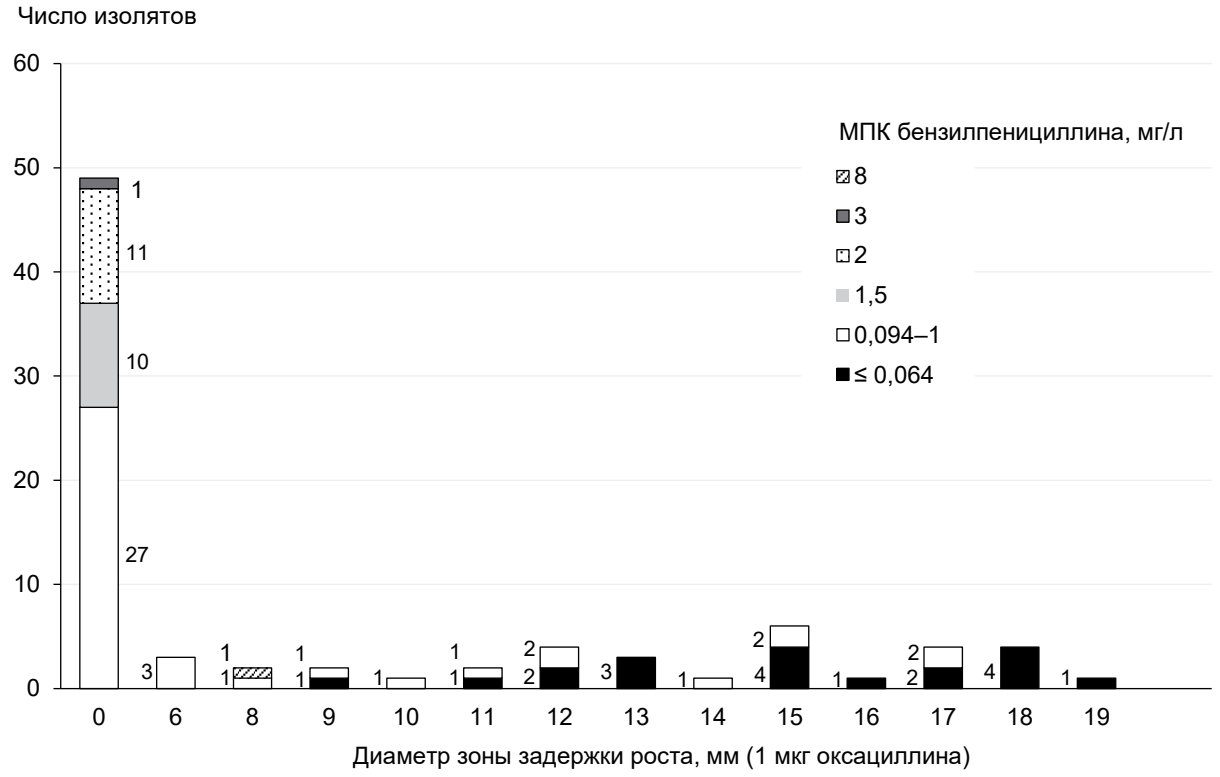


Рис. 1. МПК бензилпенициллина у изолятов *S. pneumoniae*, демонстрирующих положительный результат скрининга с 1 мкг оксациллина (n = 83).

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-660

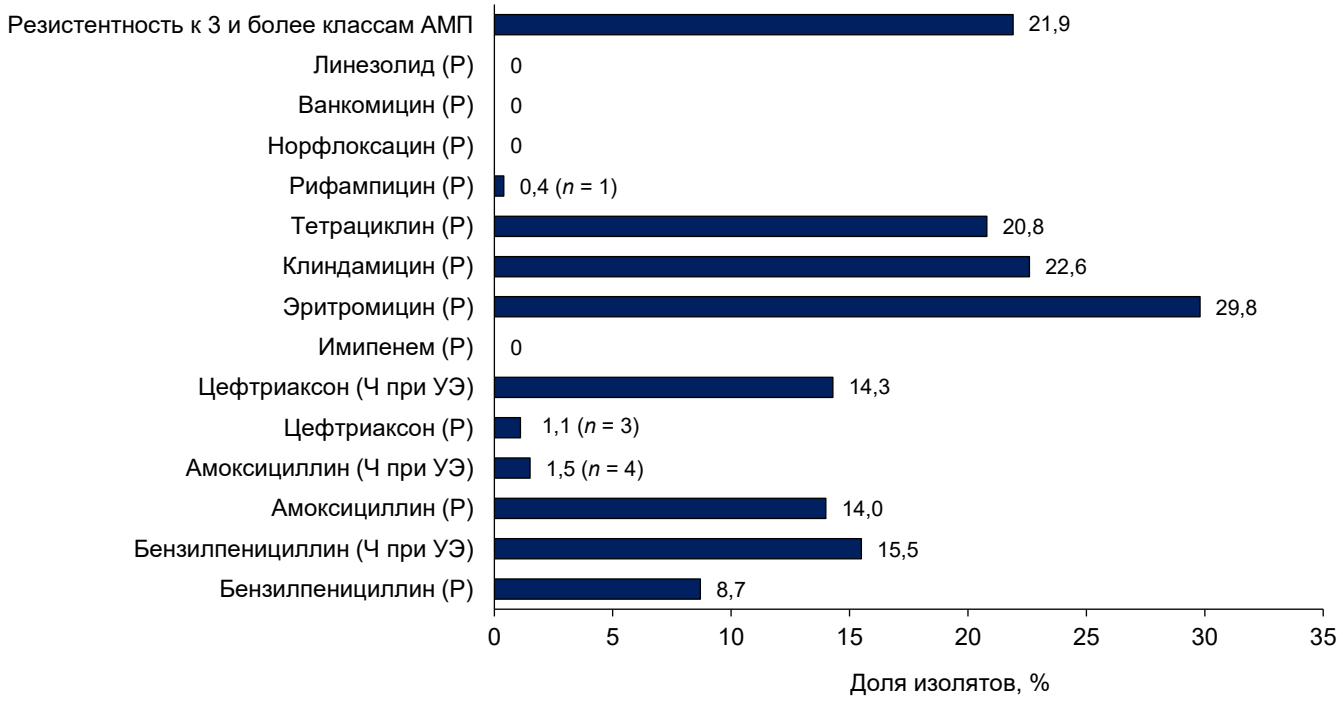


Рис. 2. Распространённость изолятов *S. pneumoniae,* резистентных к АМП.

Здесь и на рис. 3: Р — резистентные; Ч — чувствительные; УЭ — увеличенная экспозиция.

экспозиции к пенициллину, мутации в генах, кодирующих ПСБ, были выявлены в 100% случаев. У чувствительных к пенициллину пневмококков мутации в генах ПСБ были выявлены в 11,4% случаев, а в 88,6% — отсутствовали.

Резистентность к эритромицину выявлена у 29,8% (79 из 265) изолятов (рис. 2), при этом гены резистентности к макролидам присутствовали у 98,7%. В 41,8% случаев обнаружен только ген *ermB,* кодирующий метилирование 23S рРНК, в 20,3% — только гены макролидного эффлюкса *mef.* Сочетание указанных генов выявлено у 38% изолятов. У пневмококков, чувствительных к эритромицину, гены макролидрезистентности не обнаруживались.

S. pneumoniae, резистентные к клиндамицину, составили 22,6% (60 из 265), индуцибельной резистентностью обладали 3 (1,1%) изолята. В 61,7% случаев у клиндамицинрезистентных изолятов обнаруживался ген *ermB,* в 38,3% — комбинация генов *ermB* и *mef.*

Пятая часть — 20,8% (55 из 265) полученных культур *S. pneumoniae* — обнаруживали резистентность к тетрациклину (рис. 2). Ген «рибосомальной защиты» *tetM* присутствовал у 98,2% данных изолятов и не выявлялся у пневмококков, чувствительных к тетрациклину.

S. pneumoniae, устойчивые одновременно к 3 и более классам АМП, обнаружены в 21,9% случаев (рис. 2).

Резистентность к рифампицину выявили лишь в 1 случае. Все исследуемые изоляты были чувствительны к фторхинолонам, ванкомицину и линезолиду.

При анализе чувствительности *S. pneumoniae* к β-лактамам в зависимости от периода наблюдения были выявлены различия. В раннем поствакцинальном периоде 23 изолята являлись пенициллинрезистентными, 37 обладали резистентностью к амоксициллину, 3 изолята были резистентны к цефтриаксону (согласно критериям для инфекций, кроме эндокардита и менингита) (**рис. 3**). Доли изолятов, чувствительных при увеличенной экспозиции к пенициллину, амоксициллину и цефтриаксону, составили 12,9, 2,0 и 18,9% соответственно.

В позднем поствакцинальном периоде изоляты, резистентные к пенициллину, амоксициллину и цефтриаксону, не были выявлены (χ^2 = 8,02; p = 0,005; χ^2 = 13,69, p = 0,000 и χ^2 = 0,97; p = 0,326 соответственно) (рис. 2). Доли изолятов, чувствительных при увеличенной экспозиции к пенициллину, амоксициллину и цефтриаксону, составили 23,4% (χ^2 = 4,09; p = 0,044), 4,7% (χ^2 = 1,37; p = 0,242) и 0% (χ^2 = 14,13; p = 0,000) соответственно.

Распространённость *S. pneumoniae*, устойчивых к макролидам, клиндамицину и тетрациклину, в представленные периоды существенно не изменилась (χ^2 = 1,51; p = 0,219; χ^2 = 0,26; p = 0,610 и χ^2 = 0,21; p = 0,650 соответственно; рис. 3). Доля пневмококков, обладающих индуцибельной резистентностью к клиндамицину, составила 1% (2 изолята) в раннем и 1,6% (1 изолят) в позднем поствакцинальных периодах.

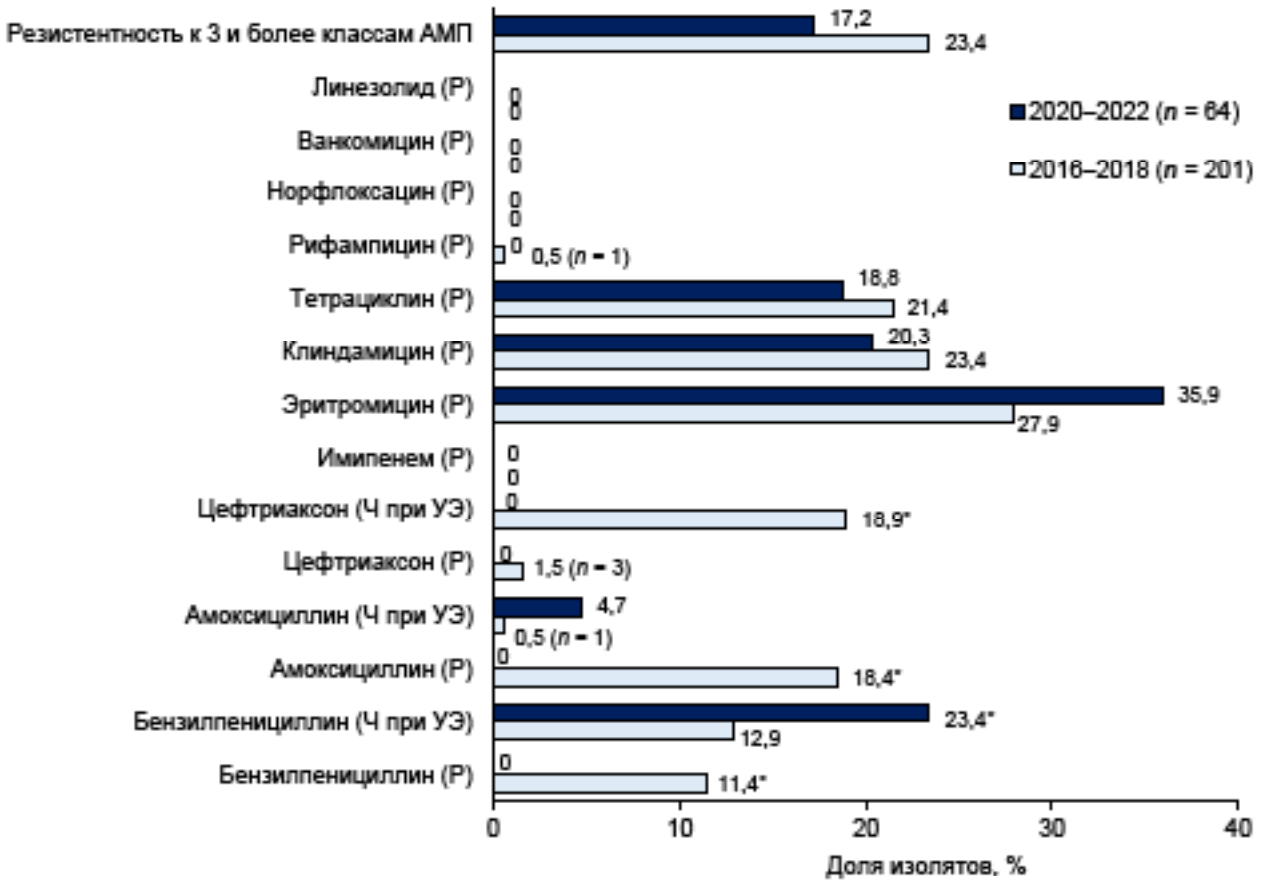


Рис. 3. Распространённость изолятов *S. pneumoniae,* резистентных к АМП.
*Различия статистически значимы.

Доля *S. pneumoniae,* проявляющих устойчивость одновременно к 3 и более классам АМП, в периоды наблюдений не отличалась (χ^2 = 1,09; p = 0,297; рис. 3). При этом в раннем поствакциональном периоде большая часть данных изолятов проявляла одновременную устойчивость к β-лактамам, макролидам, линкозамидам и тетрациклинам (69,6%), а в позднем периоде фенотип всех пневмококков,

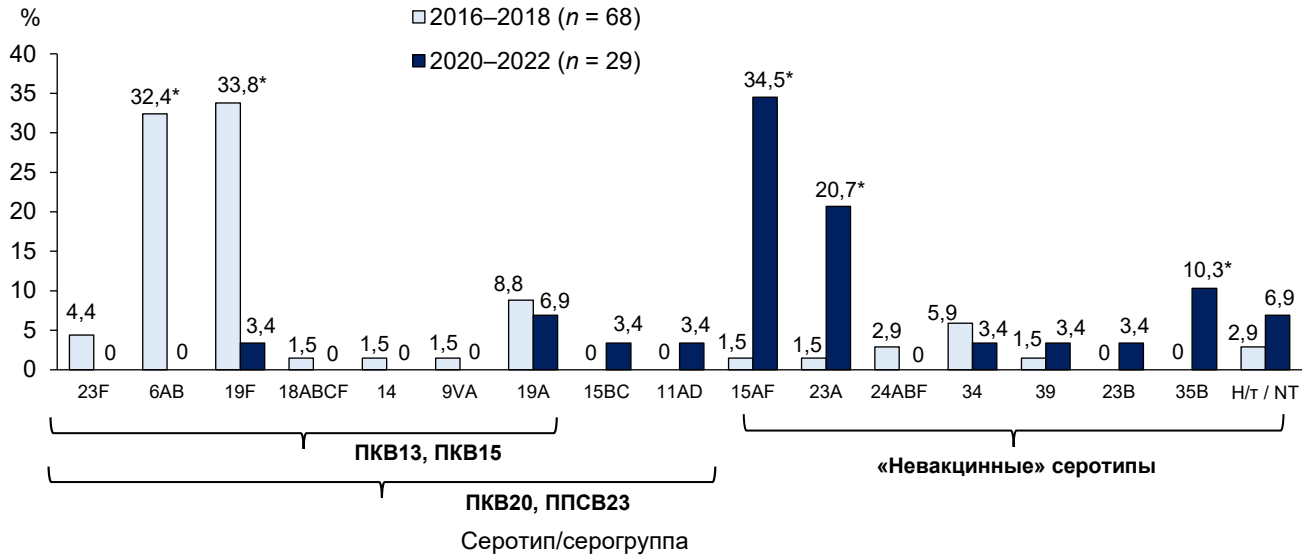


Рис. 4. Динамика распространённости серотипов (серогрупп) *S. pneumoniae*, резистентных к АМП.
Н/т (нетипируемые) — изоляты, серотип которых не определён (не входит в стандартную схему серотипирования).
ППСВ23 — 23-валентная пневмококковая полисахаридная вакцина. *Различия статистически значимы.

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-660

резистентных к 3 и более классам АМП (100%), характеризовался одновременной устойчивостью к макролидам, линкозамидам и тетрациклинам.

При исследовании серотипового пейзажа резистентных *S. pneumoniae* в раннем и позднем поствакцинальном периодах выявлены существенные различия (**рис. 4**). В 2016–2018 гг. отмечалось преобладание серотипов, относящихся к «вакцинным» — включённым в состав применяемой 13-валентной конъюгированной вакцины: 19F (χ^2 = 10,07; p = 0,002), 6A и 6B (χ^2 = 12,13; p = 0,000). В 2020–2022 гг. преобладали «невакцинные» типы/серогруппы пневмококка: 15AF (χ^2 = 22,04; p = 0,000), 23A (χ^2 = 11,22; p = 0,000) и 35B (χ^2 = 7,25; p = 0,008), также в данный период выявлялись *S. pneumoniae* 11-й и 15-й серогрупп (15BC и 11AD), дополнительно входящие в состав 20- и 23-валентной ПКВ.

Фенотипы резистентности *S. pneumoniae* различных серотипов и серогрупп различались: у большинства пневмококков серогруппы 19 (19F и 19A) выявлена резистентность к 3 и более классам АМП, при этом обращает на себя внимание высокий удельный вес изолятов, резистентных к пенициллину (**табл. 2**). Более низкая распространённость *S. pneumoniae,* устойчивых одновременно к 3 и более классам АМП, обнаружена среди представителей 6-й серогруппы — 6A и 6B. Все пневмококки серотипа 23A также были резистентны к 3 и более классам АМП, при этом устойчивость к пенициллину у представителей данного серотипа не установлена.

Среди пневмококков, относящихся к серогруппе 15AF, преобладали макролидрезистентные изоляты. У всех *S. pneumoniae* серотипов 23F, 34 и 35B выявлялась чувствительность при увеличенной экспозиции к пенициллину. Все изоляты серотипа 35B являлись макролидрезистентными и имели гены *mef* (табл. 2).

Обсуждение

В настоящей работе представлены результаты анализа популяции пневмококков, выделенных из носоглотки здоровых детей дошкольного возраста в 2016–2022 гг. на фоне применения ПКВ13 в соответствии с национальным календарем профилактических прививок РФ. При этом резистентные изоляты *S. pneumoniae*, полученные в 2016–2018 гг. (ранний поствакцинальный период), в подавляющем большинстве были выделены от детей, не вакцинированных против пневмококковой инфекции (77,9%), а полученные в 2020–2022 гг. (поздний

Таблица 2. Фенотипы и генетические механизмы резистентности пневмококков, относящихся к серотипам, преобладающим в раннем и позднем поствакцинальных периодах

Серотип/ серогруппа	Количество изолятов	Доля резистентных изолятов, % или абсолютное число при количестве изолятов менее 10						Выявленные механизмы резистентности, % или абсолютное число при количестве изолятов менее 10			
		бензилпенициллин*	амоксициллин	цефтриаксон	эритромицин	клиндамицин	тетрациклин	мутации в генах ПСБ	ген *ermB*	ген *mef*	ген *tet*
Ранний поствакцинальный период											
23F	3	Р — 0 Ч при УЭ — 3	0	0	0	0	0	*pbp1a* + *pbp2b* — 2; *pbp1a* + *pbp2b* + *pbp2x* — 1	0	0	0
6AB	22	Р — 9,1% Ч при УЭ — 91,9%	9,1	0,0	95,5	90,1	59,1	*pbp1a* + *pbp2b* + *pbp2x* — 22,7; *pbp2x* + *pbp2b* — 68,2	95,5	22,7	95,5
19F	24	Р — 70,8% Ч при УЭ — 29,2%	95,8	8,3	100,0	83,3	54,2	*pbp1a* + *pbp2b* + *pbp2x* — 95,8; *pbp2x* — 4,2	83,3	83,3	87,5
19A	8	Р — 3 Ч при УЭ — 5	6	1	8	8	8	*pbp1a* + *pbp2b* + *pbp2x* — 8	8	8	8
34	5	Р — 0 Ч при УЭ — 5	4	0	0	0	0	*pbp1a* + *pbp2b*+ *pbp2x* — 5	0	0	0
Поздний поствакцинальный период											
15AF	11	Р — 0,0% Ч при УЭ — 36,4%	0,0	0,0	81,8	36,4	27,3	*pbp1a* + *pbp2b* + *pbp2x* — 45,5	36,4	45,5	27,3
23A	7	Р — 0 Ч при УЭ — 4	0	0	7	7	6	*pbp2x* + *pbp2b* — 6	7	0	6
39	2	Р — 0 Ч при УЭ — 2	1	0	0	0	0	*pbp1a* + *pbp2b* + *pbp2x* — 2	0	0	0
35B	3	Р — 0 Ч при УЭ — 3	0	0	3	0	0	*pbp1a* + *pbp2b* + *pbp2x* — 3	0	3	0

Примечание. *Для бензилпенициллина указана доля резистентных изолятов (Р), а также чувствительных при увеличенной экспозиции (Ч при УЭ).

поствакцинальный период) — в основном выделялись от детей, привитых полностью (трехкратно), и составили 75,9%. Соответственно, за истекший период увеличилась и доля полностью привитых детей — с 1,9 до 68,8% (χ^2 = 691,47; p = 0,000), что свидетельствует о значительном увеличении охвата иммунизацией.

Динамика резистентности к АМП в бактериальной популяции зависит от многих факторов, одним из которых, в случае *S. pneumoniae*, является вакцинопрофилактика. Доказано, что применение конъюгированных вакцин приводит к снижению частоты и длительности колонизации верхних дыхательных путей пневмококками — прежде всего, теми их серотипами, которые включены в состав вакцины [6–8]. При этом данные по изменению серотипового состава и резистентности *S. pneumoniae* на фоне иммунизации населения конъюгированными вакцинами противоречивы [16–21]. Так, результаты исследования, проведённого в Японии, наряду с обнаружением изменений серотипового пейзажа и новых серотипов 15A и 35B, показали значительный рост резистентности *S. pneumoniae* к β-лактамным антибиотикам — пенициллину и меропенему — на фоне применения ПКВ13 [16]. О повышении уровня резистентности свидетельствует и исследование, проведённое в Португалии: на фоне иммунизации детей в рамках национальной программы ПКВ13 удельный вес пневмококков, устойчивых к пенициллину и макролидам, возрос с 9,3 и 13,4% до 20% за счёт преобладания «невакцинных» серотипов 11A, 15BC, 24F, 15A и 21 [17].

Полученные нами данные также свидетельствуют об изменении серотипового состава популяции резистентных пневмококков: на смену серотипам, преобладающим в раннем поствакцинальном периоде, — 19F, 6A и 6B — пришли «невакцинные» варианты 15AF, 23A и др. Соответственно, если в раннем поствакцинальном периоде 83,8% резистентных пневмококков относились к «вакцинным», входящим в состав ПКВ13, то в позднем поствакцинальном периоде доля таких изолятов составила лишь 10,3% (χ^2 = 46,52; p = 0,000).

Данные о циркуляции резистентных *S. pneumoniae* в России представлены в основном результатами исследований, в том числе многоцентровых, включающих изоляты, полученные как от взрослых, так и от детей — носителей и больных с различными нозологическими формами ПИ [18–23].

Так, в работе З.А. Алачевой и соавт. среди изолятов, полученных от детей в 2017–2022 гг., уровень резистентности к эритромицину составил 33%, тетрациклину — 26%, триметоприму/сульфаметоксазолу — 25%, клиндамицину — 19% [18]. Большинство изолятов были чувствительны к пенициллину, 27% являлись чувствительными при увеличенной экспозиции. Резистентность одновременно к 3 и более классам АМП выявлена у 24,2% пневмококков, из них большая часть относилась к серотипу 19F [18]. По данным многоцентрового исследования SPECTRUM, в которое были включены изоляты *S. pneumoniae*, полученные от взрослых, резистентность к эритромицину пневмококков, выделенных от бактерионосителей, составила 23,2%, к тетрациклину — 25,5%. Штаммы, чувствительные при увеличенной экспозиции к пенициллину, встречались в 16,3% случаев [19].

Результаты, полученные нами в аналогичный период (2016–2022 гг.), сопоставимы с данными, представленными выше: доля изолятов пневмококка, резистентных к эритромицину, составила 29,8%, к тетрациклину — 20,8%, к клиндамицину — 22,6%. Изоляты, чувствительные при повышенной экспозиции к пенициллину, составили 15,5%, резистентные — 8,7%. Пневмококки, устойчивые одновременно к 3 и более классам АМП, встречались в 21,9% случаев. При этом у всех изолятов *S. pneumoniae*, демонстрирующих резистентность, а также чувствительность при увеличенной экспозиции к пенициллину, выявлялись изменённые гены, кодирующие ПСБ. У макролидрезистентных изолятов пневмококка в 41,8% случаев выявлен ген *ermB*, в 20,3% — гены макролидного эффлюкса *mef*, в 38% — комбинация данных генов. Устойчивость к клиндамицину в 61,7% случаев была ассоциирована с наличием гена *ermB*, а в 38,3% — с сочетанием генов *ermB* и *mef*. Тетрациклинрезистентные *S. pneumoniae* в 98,2% случаев обнаруживали ген «рибосомальной защиты» *tetM*.

Сравнительный анализ распространённости резистентных *S. pneumoniae* в 2016–2018 и 2020–2022 гг. выявил отсутствие изолятов, устойчивых к β-лактамам, — пенициллину (χ^2 = 8,02; p = 0,005), амоксициллину (χ^2 = 13,69; p = 0,000) и цефтриаксону (χ^2 = 0,97; p = 0,326), в позднем поствакцинальном периоде, в то время как в раннем поствакцинальном периоде доля пневмококков, резистентных к данным препаратам, составляла 11,4, 18,4 и 1,5% соответственно. Также в позднем поствакцинальном периоде не выявлено изолятов, чувствительных при увеличенной экспозиции к цефтриаксону, а в 2016–2018 гг. доля таких изолятов составила 18,9% (χ^2 = 14,13; p = 0,000). Аналогичные данные были получены в исследованиях H. Dabaja-Younis и соавт. [21] и K. Andrejko и соавт. [22], продемонстрировавших значительное снижение распространённости пенициллинрезистентных пневмококков в детской популяции на фоне вакцинопрофилактики ПИ.

Доля макролидрезистентных пневмококков на фоне иммунизации оставалась высокой и имела тенденцию к росту, увеличившись с 27,9 до 35,9%. При этом доля *S. pneumoniae*, устойчивых к клин-

дамицину и тетрациклину, среди выявленных резистентных изолятов значительно снизилась — с 69,1 до 44,8% (χ^2 = 5,08; p = 0,025) и с 63,2 до 41,4% (χ^2 = 3,96; p = 0,047), однако в расчёте на общую популяцию пневмококков снижение было незначительным. Распространённость пневмококков, устойчивых одновременно к 3 и более классам АМП, среди детей дошкольного возраста существенно не изменилась, составив 23,4 и 17,2% в раннем и позднем поствакцинальном периоде соответственно. В течение всего анализируемого периода антибиотикорезистентность «вакцинных» серотипов *S. pneumoniae* в целом была выше, чем «невакцинных», что коррелирует с данными исследования ПЕГАС (2015–2020 гг.) [23].

Выводы

На фоне рутинной иммунизации детей ПКВ13 наблюдается уменьшение распространённости пневмококков со сниженной чувствительностью к β-лактамам: амоксициллину на 14,2% (χ^2 = 7,50; p = 0,007) и цефтриаксону на 20,4% (χ^2 = 15,44; p = 0,000), а также тенденция к уменьшению распространённости изолятов, резистентных к линкозамидам и тетрациклинам. Устойчивость *S. pneumoniae* к макролидам в позднем поствакцинальном периоде остаётся на высоком уровне — 35,9%.

Резистентные изоляты *S. pneumoniae* в основном относятся к серогруппе 15 (15AF) и серотипу 23A, не входящим в состав применяемой ПКВ13.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. O'Reilly R., Yokoyama S., Boyle J., et al. The impact of acute pneumococcal disease on health state utility values: a systematic review. *Qual. Life Res*. 2022;31(2):375–88. DOI: https://doi.org/10.1007/s11136-021-02941-y
2. Tantawichien T., Hsu L.Y., Zaidi O., et al. Systematic literature review of the disease burden and vaccination of pneumococcal disease among adults in select Asia-Pacific areas. *Expert. Rev. Vaccines*. 2022;21(2):215–26. DOI: https://doi.org/10.1080/14760584.2022.2016399
3. Navarro-Torné A., Montuori E.A., Kossyvaki V., Méndez C. Burden of pneumococcal disease among adults in Southern Europe (Spain, Portugal, Italy, and Greece): a systematic review and meta-analysis. *Hum. Vaccin. Immunother*. 2021;17(10): 3670–86. DOI: https://doi.org/10.1080/21645515.2021.1923348
4. Micoli F., Romano M.R., Carboni F., et al. Strengths and weaknesses of pneumococcal conjugate vaccines. *Glycoconj. J*. 2023;40(2):135–48. DOI: https://doi.org/10.1007/s10719-023-10100-3
5. Авдеев С.Н., Алыева М.Х., Баранов А.А. и др. Вакцинопрофилактика пневмококковой инфекции у детей и взрослых. Методические рекомендации. *Профилактическая медицина*. 2023;26(9-2):3–23. Avdeev S.N., Alyeva M.H., Baranov A.A., et al. Federal clinical guidelines on vaccination of pneumococcal infection in children and adults. *Russian Journal of Preventive Medicine*. 2023;26(9-2):3–23. DOI: https://doi.org/10.17116/profmed2023260923 EDN: https://elibrary.ru/ufufle
6. Li L., Ma J., Yu Z., et al. Epidemiological characteristics and antibiotic resistance mechanisms of *Streptococcus pneumoniae:* An updated review. *Microbiol. Res*. 2023;266:127221. DOI: https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127221
7. Watkins E.R., Kalizang'Oma A., Gori A., et al. Factors affecting antimicrobial Resistance in *Streptococcus pneumoniae* following vaccination introduction. *Trends Microbiol*. 2022;30(12):1135–45. DOI: https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.06.001
8. Knupp-Pereira P.A., Cabral A.S., Dolores Í.M., et al. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae* before and after the introduction of pneumococcal conjugate vaccines in Brazil: a systematic review. *Antibiotics*. 2024;13(1):66. DOI: https://doi.org/10.3390/antibiotics13010066
9. Исаева Г.Ш., Цветкова И.А., Никитина Е.В. и др. Молекулярно-генетическая характеристика *Streptococcus pneumoniae* серогрупп 15 и 11, циркулирующих в России, и их связь с глобальными генетическими линиями. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(4):483–501. Isaeva G.Sh., Tsvetkova I.A., Nikitina E.V., et al. Molecular genetic characteristics of *Streptococcus pneumoniae* serogroups 15 and 11 representatives circulating in Russia and their relationship with global genetic lineages. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2024;101(4):483–501. DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-498 EDN: https://elibrary.ru/gciets
10. Ben Ayed N., Ktari S., Jdidi J., et al. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Tunisian healthy under-five children during a three-year survey period (2020 to 2022). *Vaccines*. 2024;12(4):393. DOI: https://doi.org/10.3390/vaccines12040393
11. Исаева Г.Ш., Зарипова А.З., Баязитова Л.Т. и др. Характеристика бактерионосительства *Streptococcus pneumoniae* в детской популяции. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(1):89–99. Isaeva G.Sh., Zaripova A.Z., Bayazitova L.T., et al. Characteristics of *Streptococcus pneumoniae* carriage in the pediatric population. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2024;101(1):89–99. DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-445 EDN: https://elibrary.ru/wqbjrf
12. Гирина А.А., Петровский Ф.И., Петровская Ю.А., Заплатников А.Л. Частота носительства *S. pneumoniae* у организованных детей г. Ханты-Мансийска. *РМЖ. Мать и дитя.* 2023;6(2):164–8. Girina A.A., Petrovsky F.I., Petrovskaya Yu.A., Zaplatnikov A.L. Frequency of *S. pneumoniae* carriage in organized children of Khanty-Mansiysk. *Russian Journal of Woman and Child Health*. 2023;6(2):164–8. DOI: https://doi.org/10.32364/2618-8430-2023-6-2-164-168 EDN: https://elibrary.ru/ivnfhy
13. Reinert R.R., Filimonova O.Y., Al-Lahham A., et al. Mechanisms of macrolide resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolates from Russia. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2008;52(6):2260–2. DOI: https://doi.org/10.1128/aac.01270-07
14. Poyart C., Jardy L., Quesne G., et al. Genetic basis of antibiotic resistance in *Streptococcus agalactiae* strains isolated in a French hospital. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2003;47(2):794–7. DOI: https://doi.org/10.1128/aac.47.2.794-797.2003
15. Knupp-Pereira P.A., Cabral A.S., Dolores Í.M., et al. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae* before and after the introduction of pneumococcal conjugate vaccines in Brazil: a systematic review. *Antibiotics (Basel)*. 2024;13(1):66. DOI: https://doi.org/10.1093/jac/48.6.915
16. Ono T., Watanabe M., Hashimoto K., et al. Serotypes and antibiotic resistance of *Streptococcus pneumoniae* before and after the introduction of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine for adults and children in a rural area in Japan. *Pathogens*. 2023;12(3):493. DOI: https://doi.org/10.3390/pathogens12030493

17. Candeias C., Almeida S.T., Paulo A.C., et al. *Streptococcus pneumoniae* carriage, serotypes, genotypes, and antimicrobial resistance trends among children in Portugal, after introduction of PCV13 in National Immunization Program: a cross-sectional study. *Vaccine*. 2024;42(22):126219.
DOI: https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2024.126219
18. Алачева З.А., Алябьева Н.М., Комягина Т.М., Тряпочкина А.С. Серотиповой состав и антибиотикорезистентность *Streptococcus pneumoniae*, выделенных у детей. *Российский педиатрический журнал*. 2024;27(S1):11–2. Alacheva Z.A., Alyabieva N.M., Komyagina T.M., Tryapochkina A.S. Serotypes and antibiotic resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolated from children. *Russian Pediatric Journal*. 2024;27(S1):11–2.
EDN: https://elibrary.ru/zjpehw
19. Куркова А.А., Муравьев А.А., Козлов Р.С. Современное состояние антимикробной резистентности *Streptococcus pneumoniae* и специфической вакцинопрофилактики пневмококковой инфекции. *Пульмонология*. 2023;33(4):534–41. Kurkova A.A., Muraviov A.A., Kozlov R.S. The current status of antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* and specific vaccine prevention of pneumococcal infection. *Pulmonologiya*. 2023;33(4):534–41.
DOI: https://doi.org/10.18093/0869-0189-2022-3655
EDN: https://elibrary.ru/astwbo
20. Филимонова О.Ю., Сафонова Т.Б., Золотарева Л.В. и др. Динамика и клиническая значимость резистентности *Streptococcus pneumoniae* к антибактериальным препаратам. *Бактериология*. 2023;8(4):7–13. Filimonova O.Yu., Safonova T.B., Zolotareva L.V., et al. Dynamics and clinical significance of resistance *Streptococcus pneumoniae* to antibacterial drugs. *Bacteriology*. 2023;8(4):7–13.
EDN: https://elibrary.ru/gqvzst
21. Dabaja-Younis H., Geller D., Geffen Y., et al. The impact of pneumococcal conjugate vaccine-13 on the incidence of pediatric community-acquired bacteremia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 2021;40(7):1433–9.
DOI: https://doi.org/10.1007/s10096-021-04167-9
22. Andrejko K., Ratnasiri B., Hausdorff W.P., et al. Antimicrobial resistance in paediatric *Streptococcus pneumoniae* isolates amid global implementation of pneumococcal conjugate vaccines: a systematic review and meta-regression analysis. *Lancet Microbe*. 2021;2(9):e450–60.
DOI: https://doi.org/10.1016/s2666-5247(21)00064-1
23. Чагарян А.Н., Иванчик Н.В., Кузьменков А.Ю. и др. Молекулярно-биологическая характеристика изолятов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от больных пневмококковым менингитом. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2025;102(2):150–61. Chagaryan A.N., Ivanchik N.V., Kuzmenkov A.Yu., et al. Molecular and biological characterization of *Streptococcus pneumoniae* isolates from patients with pneumococcal meningitis. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2025;102(2): 150–61.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-614
EDN: https://elibrary.ru/nraeks

Информация об авторах

Протасова Ирина Николаевна✉ — д-р мед. наук, доцент каф. микробиологии им. доцента Б.М. Зельмановича Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, Россия, ovsyanka802@gmail.com, https://orcid.org/0000-0001-6521-8615

Фельдблюм Ирина Викторовна — д-р мед. наук, профессор, зав. каф. эпидемиологии Пермского государственного медицинского университета им. акад. Е.А. Вагнера, Пермь, Россия, irinablum@mail.ru, https://orcid.org/0000-0003-4398-5703

Бахарева Наталья Васильевна — врач-эпидемиолог Красноярского краевого центра профилактики и борьбы со СПИД, Красноярск, Россия, bakhareva@kraszdrav.ru, https://orcid.org/0009-0009-8203-328X

Зиновьева Людмила Васильевна — заместитель главного врача Красноярской городской детской больницы № 8, Красноярск, Россия; lzinovieva@gdb8.ru, https://orcid.org/0009-0005-5176-6190

Кулик Елена Викторовна — зав. отд. оказания медицинской помощи детям в образовательных учреждениях Красноярской городской детской поликлиники № 2», Красноярск, Россия, kulik@gdp2krsk.ru, https://orcid.org/0009-0006-4140-4812

Участие авторов: *Протасова И.Н.* — проведение эксперимента, написание статьи; *Фельдблюм И.В.* — разработка дизайна исследования, анализ данных, редактирование текста статьи; *Бахарева Н.В.* — организация исследования, анализ данных, редактирование текста статьи; *Зиновьева Л.В.* — сбор данных (обследование детей на носительство *Streptococcus pneumoniae*), редактирование текста статьи; *Кулик Е.В.* — сбор данных (обследование детей на носительство *Streptococcus pneumoniae*), редактирование текста статьи. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 14.05.2025;
принята к публикации 21.07.2026;
опубликована 28.08.2025

Information about the authors

Irina N. Protasova✉ — Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of microbiology named after Associate Professor B.M. Zelmanovich, Professor V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russia, ovsyanka802@gmail.com, https://orcid.org/0000-0001-6521-8615

Irina V. Feldblium — Dr. Sci. (Med.), Professor, Head, Epidemiology department, Perm State Medical University named after Academician E.A. Wagner, Perm, Russia, irinablum@mail.ru, https://orcid.org/0000-0003-4398-5703

Natalya V. Bakhareva — epidemiologist, Krasnoyarsk Regional Center for Prevention and Control of AIDS, Krasnoyarsk, Russia, bakhareva@kraszdrav.ru, https://orcid.org/0009-0009-8203-328X

Ludmila V. Zinovieva — Deputy chief physician, Krasnoyarsk City Children's Hospital No. 8, Krasnoyarsk, Russia, lzinovieva@gdb8.ru, https://orcid.org/0009-0005-5176-6190

Elena V. Kulik — Head, Department of medical care for children in educational institutions, Krasnoyarsk City Children's Clinic No. 2, Krasnoyarsk, Russia, kulik@gdp2krsk.ru, https://orcid.org/0009-0006-4140-4812

Authors' contribution: *Protasova I.N.* — conducting the experiment, writing the article; *Feldblum I.V.* — developing the study design, data analysis, editing the article text; *Bakhareva N.V.* — organizing the study, data analysis, editing the article text; *Zinovieva L.V.* — collecting data (examining children for carriage of *Streptococcus pneumoniae*), editing the article text; *Kulik E.V.* — collecting data (examining children for carriage of *Streptococcus pneumoniae*), editing the article text. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a substantial contribution to the conception of the article, acquisition, analysis, interpretation of data for the article, drafting and revising the article, final approval of the version to be published.

The article was submitted 14.05.2025;
accepted for publication 21.07.2026;
published 28.08.2025

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-640
ORIGINAL RESEARCHES

Оригинальное исследование
https://doi.org/10.36233/0372-9311-640

Анализ генов антифаговых систем нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор

Заднова С.П., Плеханов Н.А., Сергутин Д.А.✉, Челдышова Н.Б., Федоров А.В., Краснов Я.М.

Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия

Аннотация

Актуальность. Наличие и структура антифаговых систем, способствующих устойчивости холерных вибрионов к литическим фагам, у нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара El Tor, выделенных на территории России и сопредельных стран, не изучена.

Цель — выявление и анализ антифаговых систем нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor.

Материалы и методы. В работе использовали 126 нетоксигенных (*ctxAB⁻tcpA⁺* и *ctxAB⁻tcpA⁻*) штаммов *V. cholerae* O1 El Tor, изолированных с 1972 по 2018 г. Секвенирование ДНК проводили на платформе MGI DNBSEQ-G50. Для биоинформатического анализа применяли программы fastp v. 0.23, unicycler v. 0.4.7, Blast 2.16.0, MEGA X, CRISPRCastyper и CRISPRCasFinder.

Результаты. В геноме изученных штаммов не выявлены фагоиндуцируемые острова PLE, BREX и DISARM-системы. Установлено, что 80% *ctxAB⁻tcpA⁺*-штаммов содержат систему рестрикции–модификации I типа, у *ctxAB⁻tcpA⁻*-изолятов данная система не обнаружена. Гены CBASS-системы выявлены у единичных штаммов обеих групп. В геноме 35 (32%) изученных *ctxAB⁻tcpA⁻*-штаммов, выделенных в разных регионах РФ и сопредельных странах, установлено наличие CRISPR–Cas-системы 1-го класса типов I (подтипы I-E, I-F, I-C) и III (подтип III-B). Количество спейсеров в данной системе варьировало от 0 до 80, их последовательность была гомологична протоспейсерным участкам ДНК литических и умеренных фагов, транспозонов, плазмид *V. cholerae*, представителей рода *Vibrio* и неродственных бактерий. Наличие у ряда штаммов спейсеров, гомологичных генетическому материалу фага, циркулирующему на эндемичных территориях, может указывать на завозной характер данных штаммов.

Заключение. Выявлена гетерогенность изученных нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor по наличию антифаговых систем, что расширяет сведения об их генетической организации. В их геноме выявлены системы рестрикции–модификации I типа (*ctxAB⁻tcpA⁺*), CBASS (*ctxAB⁻tcpA⁺* и *ctxAB⁻tcpA⁻*) и CRISPR–Cas 1-го класса типов I (подтипы I-E, I-F, I-C) и III (*ctxAB⁻tcpA⁻*). Выявление нескольких типов и подтипов CRISPR–Cas-системы в геноме ряда *ctxAB⁻tcpA⁻*-штаммов может указывать на её неоднократное приобретение посредством горизонтального переноса.

Ключевые слова: *нетоксигенные штаммы Vibrio cholerae, антифаговые системы, CRISPR–Cas-система 1-го класса*

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: Заднова С.П., Плеханов Н.А., Сергутин Д.А., Челдышова Н.Б., Федоров А.В., Краснов Я.М. Анализ генов антифаговых систем нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2025;102(4):456–464.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-640
EDN: https://www.elibrary.ru/XNHHRX

Original Study Article
https://doi.org/10.36233/0372-9311-640

Analysis of the gene structure of antiphage systems of non-toxigenic strains of *Vibrio cholerae* O1 biovar El Tor

Svetlana P. Zadnova, Nikita A. Plekhanov, Danil A. Sergutin✉, Nadezhda B. Cheldyshova, Andrey V. Fedorov, Yaroslav M. Krasnov

Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russia

© Заднова С.П., Плеханов Н.А., Сергутин Д.А., Челдышова Н.Б., Федоров А.В., Краснов Я.М., 2025

Abstract

Introduction. The presence and structure of antiphage systems that contribute to the resistance of cholera vibrios to lytic phages in non-toxigenic strains of *Vibrio cholerae* O1 biovar El Tor isolated in the Russian Federation and neighboring countries has not been studied.

The aim of the study is the detection and analysis of antiphage systems of non-toxigenic strains of *V. cholerae* O1 biovar El Tor.

Materials and methods. The study involved 126 non-toxigenic (*ctxAB*$^-$*tcpA*$^+$ and *ctxAB*$^-$*tcpA*$^-$) strains of *V. cholerae* O1 El Tor isolated from 1972 to 2018. DNA sequencing was performed on the MGI DNBSEQ-G50 platform. For bioinformatics analysis, the following programs were used: fastp v. 0.23, unicycler v. 0.4.7, Blast 2.16.0, MEGA X, CRISPRCasty-per and CRISPRCasFinder.

Results. Phage-inducible islands of the PLE, BREX and DISARM systems were not detected in the genome of the studied strains. It was found that 80% of *ctxAB*$^-$*tcpA*$^+$ strains contain the type I restriction-modification system, while this system was not detected in *ctxAB*$^-$*tcpA*$^-$ isolates. The genes of the CBASS system were detected in single strains of both groups. In the genome of 35 (32%) studied *ctxAB*$^-$*tcpA*$^-$ strains isolated in different regions of the Russian Federation and neighboring countries, the presence of the CRISPR–Cas system of class 1 types I (subtypes I-E, I-F, I-C) and III (subtype III-B) was established. The number of spacers in this system varied from 0 to 80 and their sequence was homologous to the protospacer regions of DNA of lytic and temperate phages, transposons, plasmids of *V. cholerae*, representatives of the genus *Vibrio* and unrelated bacteria. The presence in a number of strains of spacers homologous to the genetic material of the phage circulating in endemic territories may indicate the imported nature of these strains.

Conclusion. The heterogeneity of the studied non-toxigenic strains of *V. cholerae* O1 El Tor in the presence of antiphage systems was revealed, which expands the information on their genetic organization. In their genome, restriction-modification systems of type I (*ctxAB*$^-$*tcpA*$^+$), CBASS (*ctxAB*$^-$*tcpA*$^+$ and *ctxAB*$^-$*tcpA*$^-$) and CRISPR–Cas class 1 types I (subtypes I-E, I-F, I-C) and III (*ctxAB*$^-$*tcpA*$^-$) were identified. The detection of several types and subtypes of the CRISPR–Cas system in the genome of a number of *ctxAB*$^-$*tcpA* strains may indicate its repeated acquisition through horizontal transfer.

Keywords: *non-toxigenic strains of Vibrio cholerae, antiphage systems, CRISPR–Cas system class 1*

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: Zadnova S.P., Plekhanov N.A., Sergutin D.A., Cheldyshova N.B., Fedorov A.V., Krasnov Ya.M. Analysis of the gene structure of antiphage systems of non-toxigenic strains of *Vibrio cholerae* O1 biovar El Tor *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2025;102(4):456–464.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-640
EDN: https://www.elibrary.ru/XNHHRX

Введение

Ежегодно при проведении мониторинговых исследований водных объектов России на холеру выделяются нетоксигенные штаммы *Vibrio cholerae* O1 серогруппы биовара El Tor, лишённые генов *ctxAB* (*ctxAB*$^-$), кодирующих биосинтез холерного токсина (основной фактор вирулентности возбудителя холеры). Иногда изолируются штаммы, содержащие ген *tcpA* (*ctxAB*$^-$*tcpA*$^+$), отвечающий за продукцию основной субъединицы токсин-корегулируемых пилей адгезии (фактор колонизации). Как *ctxAB*$^-$*tcpA*$^-$-, так и *ctxAB*$^-$*tcpA*$^+$-штаммы не вызывают холеру, но могут быть причиной острых кишечных инфекций. Установлено, что нетоксигенные штаммы *V. cholerae* O1 El Tor способны длительное время сохраняться в объектах окружающей среды на территории России, образуя клональные комплексы, а также завозиться из эндемичных по холере стран [1–7]. Для выявления механизмов длительного выживания нетоксигенных штаммов во внешней среде, а также способности вызывать острые кишечные инфекции активно изучаются молекулярно-генетические особенности указанных штаммов, проводятся различные виды типирования и филогенетический анализ. В результате в геноме нетоксигенных штаммов выявлено присутствие генов, кодирующих дополнительные факторы патогенности, а также персистенции, которые могут выполнять и роль токсических субстанций. В том числе выявлены локусы, обеспечивающие подвижность, ответственные за биосинтез дополнительных токсинов, термолабильного гемолизина, протеаз, нейраминидазы, белков системы секреции 6-го и 3-го типов, маннозочувствительных пилей адгезии, а также белков-регуляторов, контролирующих транскрипцию генов вирулентности и персистенции [3, 5, 8]. Однако причины длительного выживания нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor во внешней среде до конца не установлены.

Необходимо отметить, что, находясь в воде открытых водоёмов, нетоксигенные вибрионы *V. cholerae* O1 El Tor могут подвергаться атаке бактериофагов (фагов), также присутствующих в данной среде. Показано, что холерным фагам принадлежит важная роль в генетическом разнообразии штаммов *V. cholerae* [9]. Совместное существова-

© Zadnova S.P., Plekhanov N.A., Sergutin D.A., Cheldyshova N.B., Fedorov A.V., Krasnov Ya.M., 2025

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-640

ние *V. cholerae* и фагов и необходимость обоих выживать способствуют эволюции как *V. cholerae*, так и фагов [9, 10]. Бактерии приобретают различные механизмы устойчивости к фагам посредством горизонтального переноса генов, а фаги, в свою очередь, очень быстро развивают устойчивость ко многим бактериальным защитным системам. Выявлено, что гены, кодирующие устойчивость к фагам, могут составлять более 10% бактериального генома [11].

У токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor выявлено присутствие значительного количества антифаговых систем, расположенных на мобильных генетических элементах. В том числе на острове патогенности VPI-2 находится кластер генов, кодирующих систему рестрикции-модификации I типа (*vc1764–vc1769*), действие которой основано на активности двух ферментов: эндонуклеазы рестрикции (*vc1765*) и метилтрансферазы (*vc1769*) [12]. На острове пандемичности VSP-I расположена антифаговая сигнальная система CBASS (cyclic-oligonucleotide-based antiphage signaling system), включающая оперон из 4 генов: *dncV, capV, cap2, cap3* [13, 14]. В составе ICE SXT-элементов обнаружены BREX (Bacteriophage exclusion) и DISARM (Defence Islands System Associated with Restriction-Modification) системы [10, 15, 16].

Важная роль в защите от самого распространённого на эндемичной территории фага ICP1 принадлежит фагоиндуцируемым островам PLE (Phage inducible chromosomal island-like elements), которых в настоящее время насчитывается 10 типов [17–19]. Однако у токсигенных вибрионов El Tor отсутствует система адаптивной защиты CRISPR–Cas, выявленная в геноме нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor, циркулирующих на эндемичной территории [20]. Данная система включает короткие палиндромные повторы (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats — CRISPR), спейсеры (последовательности чужеродного происхождения) и гены *cas*, кодирующие белки с различной функцией [13]. В настоящее время CRISPR–Cas-система в зависимости от механизма действия, структуры CRISPR-спейсеров и присутствия генов *cas* классифицируется на 2 класса, 6 типов и 33 подтипа.

В системе класса 1 (типы I, III, IV) с мишенью взаимодействует многокомпонентный комплекс, который состоит из нескольких белков Cas, связанных с crРНК. Системы класса 2 (типы II, V и VI) содержат только один белок (Cas9, Cas12 или Cas13), который выполняет все функции мультибелкового эффекторного комплекса.

Деление на типы основано на строении эффекторных комплексов, при этом системы одного типа включают, как правило, особый уникальный для систем этого типа белок. Типы, в свою очередь, делятся на подтипы, различающиеся особенностями в строении локуса CRISPR и, в некоторых случаях, наличием белков Cas. Так, во многих системах I типа присутствует ген *cas3*, кодирующий хеликазу-нуклеазу Cas3, которая, благодаря хеликазной активности, разъединяет двойную чужеродную спираль ДНК, а при участии нуклеазного домена фрагментирует чужеродный генетический материал. В системах III типа нуклеазной активностью обладает белок Cas10. В состав всех типов входят белки Cas1 и Cas2, формирующие комплекс и отвечающие за этап адаптации, т. е. встраивания нового спейсера в CRISPR [20, 21].

Несмотря на активное исследование антифаговых систем *V. cholerae*, их присутствие в геноме нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor, выделенных на территории России и сопредельных стран, не изучено.

Цель работы состояла в выявлении и анализе антифаговых систем нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor.

Материалы и методы

Изучали нуклеотидные последовательности полных геномов 126 нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor, выделенных с 1972 по 2018 г. на территории России и сопредельных стран. Нуклеотидные последовательности 30 штаммов (12 $ctxA^{-}tcpA^{+}$ и 18 $ctxA^{-}tcpA^{-}$) взяты из базы данных NCBI GenBank, 96 штаммов (3 $ctxA^{-}tcpA^{+}$ и 93 $ctxA^{-}tcpA^{-}$) секвенированы в данной работе. Для проведения секвенирования штаммы получали из Государственной коллекции патогенных бактерий Российского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора, где они хранились в лиофилизированном состоянии.

Подготовку геномной ДНК выполняли согласно протоколу производителя из обработанной мертиолятом натрия бактериальной суспензии с использованием коммерческого набора «Axy Prep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit» («Axygen Biosciences»).

Секвенирование проводили на платформе «MGI DNBSEQ-G50» («MGI»). Библиотеки готовили по стандартному протоколу с применением наборов «DNBSEQ-G50RS (FCLPE150)» и «MGI EasyFastPCR-FREEFS Library PrepSet» («MGI»). Контроль качества полученных прочтений осуществляли с помощью программы fastp v. 0.23, контиги собирали с использованием unicycler v. 0.4.7.

Для биоинформатического анализа применяли алгоритм Blast 2.16.0 (http://blast.ncbi) и программу MEGA X (или BioEdit v. 7.0.9.0). Для выявления системы CRISPR–Cas и спейсеров использовали программы CRISPRCastyper[1] и CRISPRCasFinder[2].

[1] https://github.com/Russel88/CRISPRCasTyper
[2] https://github.com/dcouvin/CRISPRCasFinder

Результаты

При изучении нуклеотидных последовательностей полных геномов нетоксигенных штаммов фагоиндуцируемые острова PLE не были обнаружены ни в геноме *ctxAB⁻tcpA⁻*-, ни *ctxAB⁻tcpA⁺*-штаммов. Не выявлены также системы BREX и DISARM, т. к. в данных штаммах отсутствуют элементы ICE SXT.

При анализе генов системы рестрикции–модификации I типа (*vc1765, vc1769*) среди 15 *ctxAB⁻tcpA⁺*-штаммов были выявлены 12 изолятов, которые по этим генам соответствовали токсигенному референс-штамму *V. cholerae* N16961 O1 El Tor (**таблица**). У *ctxAB⁻tcpA⁻*-штаммов гены системы рестрикции–модификации I типа не обнаружены.

Присутствие генов системы CBASS (*dncV, capV*) установлено у 4 штаммов. У *ctxAB⁻tcpA⁺*-штамма *V. cholerae* 56 структура данных генов не отличалась от таковых референс-штамма *V. cholerae* N16961 O1 El Tor. У *ctxAB⁻tcpA⁻*-штаммов *V. cholerae* P-18748, 102 и M-1457 присутствовал интактный ген *capV*, а в гене *dncV* выявлены одинаковые точечные несинонимичные мутации, приводящие к замене аминокислот, влияние которых на функциональную роль белка DncV не установлено. В геноме других штаммов указанная система отсутствовала (таблица).

Далее было изучено присутствие CRISPR–Cas-системы. В геноме *ctxAB⁻tcpA⁺*-штаммов данная система не обнаружена, в то же время среди *ctxAB⁻tcpA⁻*-штаммов выявлены 35 изолятов, имеющих CRISPR–Cas-систему 1-го класса 2 типов — I и III. Тип I был представлен тремя подтипами: I-E, I-F, I-C, а тип III — одним (III-B). У наибольшего количества штаммов (20 изолятов) выявлена CRISPR–Cas-система подтипа I-E, среди которых 10 изолятов имели только данный подтип, в остальных присутствовали дополнительные системы. Так штамм *V. cholerae* 617, кроме I-E, имел еще 2 системы (таблица). Стоит отметить, что структура системы I-E у всех штаммов была канонической и состояла из 8 *cas* генов (*cas3, cas8e, cse2, cas6, cas7, cas5, cas1, cas2*) (**рисунок**, *а*).

Три штамма — *V. cholerae* M1413, M1516, M1526 — включали подтип I-C (таблица, рисунок, *б*). Пять штаммов (*V. cholerae* 617, 102, M1457, M1516, M1526) содержали полноценную CRISPR–Cas-систему I-F подтипа с 6 *cas* генами (*cas1, cas3, cas8f, cas5, cas7, cas6f*: таблица, рисунок, *в*). У ряда штаммов выявлена усечённая I-F система (*cas6f, cas7f, cas8f*), состоящая из 3 *cas* генов, обозначенная нами I-F mini (рисунок, *г*). Стоит отметить, что в дан-

Характеристика некоторых нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor и структура их антифаговых генов

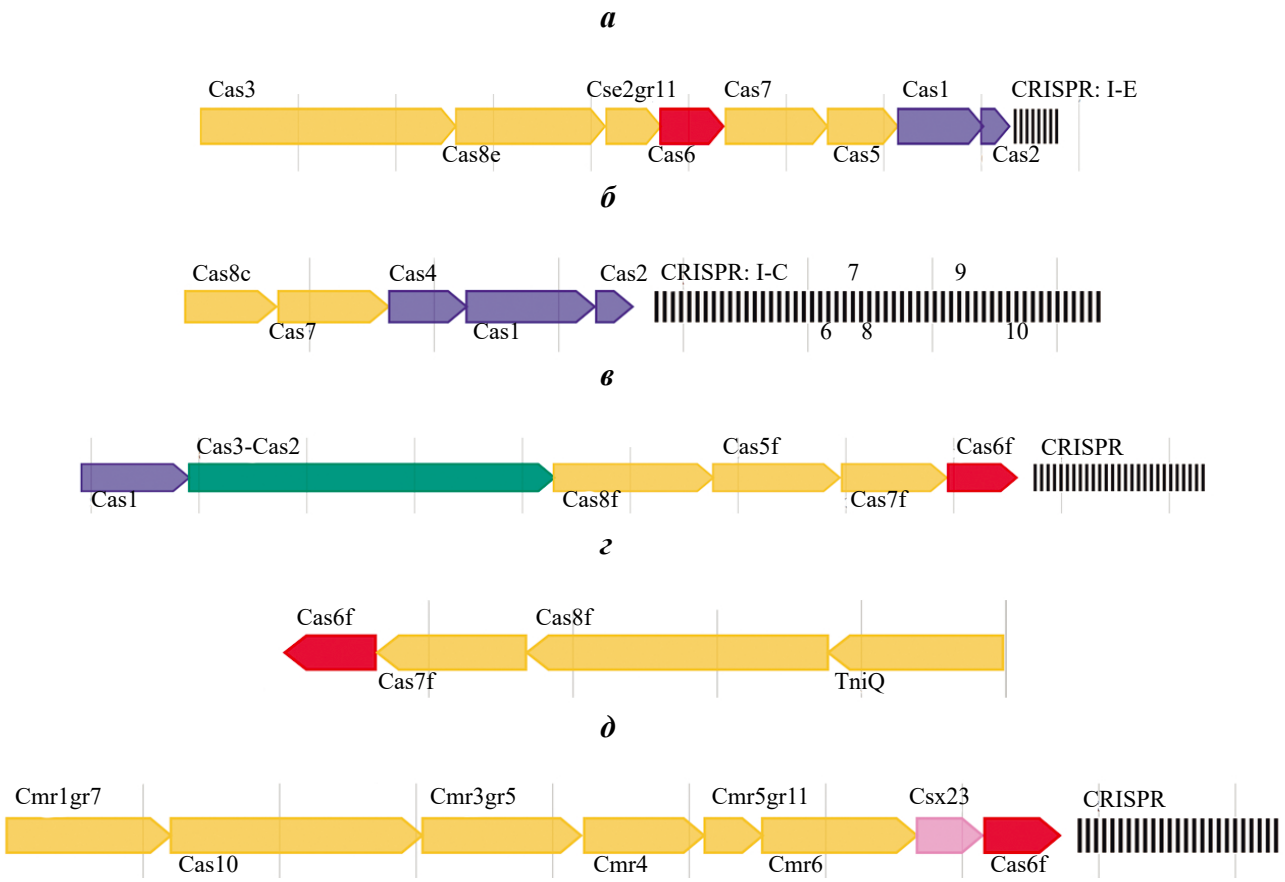
Штамм	Место, год	Источник выделения	Структура генов		Тип CRISPR–Cas-системы	Количество спейсеров
			vc1765/ vc1769	*vc0179 (dncV)/ vc0178 (capV)*		
Нетоксигенные *ctxAB⁻tcpA⁺*-штаммы						
M1395[LQBY01]	Россия, Астрахань, 1981	Внешняя среда	–	–	–	–
56[MWRD01]	Украина, Мариуполь, 1995	Больной	int	int	–	–
866[MWRF01]	Украина, Ялта, 1996	Внешняя среда	int	–	–	–
85[NEDU01]	Украина, Бердянск, 1999	Больной	int	–	–	–
P18778[NIFI01]	Россия, Ростов-на-Дону, 2005	Больной	–	–	–	–
M1434*, M1436*	Россия, Калмыкия, 2006	Внешняя среда	int	–	–	–
M1501[LRAE01]	Россия, Калмыкия, 2011	Больной	–	–	–	–
M-1504[VTLN01]	Россия, Калмыкия, 2011, 2012	Внешняя среда	int	–	–	–
M-1518[LQZR01]	Россия, Калмыкия, 2011, 2012	Внешняя среда	int	–	–	–
M-1524[LQZS01], M1528*	Россия, Калмыкия, 2013	Внешняя среда	int	–	–	–
2613[PYCA01], 2687[PYCB01]	Россия, Калмыкия, 2015	Внешняя среда	int	–	–	–
124[PYCD01]	Россия, Калмыкия, 2017	Внешняя среда	int	–	–	–
Нетоксигенные *ctxAB⁻tcpA⁻*-штаммы						
M-988[LQBX01]	Туркменистан, 1972	Внешняя среда	–	–	I-F mini	Не определено
M-658*	Россия, Уфа, 1976	Внешняя среда	–	–	I-F mini	1
M-659*	Россия, Салават, 1976	Внешняя среда	–	–	I-E	56
M-1114*	Россия, Саранск, 1977	Больной	–	–	I-E I-F mini	13 0
M-1115*	Россия, Саранск, 1977	Больной	–	–	I-E I-F mini	13 1

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-640

Окончание таблицы

Штамм	Место, год	Источник выделения	Структура генов		Тип CRISPR–Cas-системы	Количество спейсеров
			vc1765/ vc1769	*vc0179 (dncV)/ vc0178 (capV)*		
M-1394*	Россия, Каспийск, 1979	Внешняя среда	–	–	I-E	44
M-1222*	Россия, Астрахань, 1985	Внешняя среда	–	–	I-F mini	10
M-1320*	Россия, Саратов, 1998	Внешняя среда	–	–	III-B	24
617[NCTY01]	Украина, 1999	Больной	–	–	I-F** I-E III-B	26 80 25
M1337[NEEB01]	Россия, Астрахань, 2000	Больной	–	–	I-E**	1
M-1388*	Россия, Саратов, 2001	Внешняя среда	–	–	I-E I-F mini	13 1
M-1389*	Россия, Саратов, 2001	Внешняя среда	–	–	I-E I-F mini	13 1
M-1411*	Россия, Калмыкия, 2002	Больной	–	–	I-F mini	1
M-1413*	Россия, Калмыкия, 2002	Внешняя среда	–	–	I-C I-F mini	40 2
M-1426*	Россия, Пермский край, 2003	Внешняя среда	–	–	I-F mini	0
M-1428*	Россия, Астрахань, 2003	Внешняя среда	–	–	I-E	44
M-1431*	Россия, Калмыкия, 2005	Внешняя среда	–	–	I-E	60
P-18748[NIFH01]	Россия, Сочи, 2004	Больной	–	A1003G (S335G) /int	–	–
102[NDXO01]	Украина, 2006	Больной	–	A1003G (S335G) /int	I-F**	49
M-1441*	Россия, Калмыкия, 2007	Внешняя среда	–	–	I-E	48
M-1443*	Россия, Калмыкия, 2007	Внешняя среда	–	–	I-E	58
M-1444*	Россия, Калмыкия, 2007	Внешняя среда	–	–	I-E	76
M-1447*	Россия, Калмыкия, 2009	Внешняя среда	–	–	I-F	15
M-1450*	Россия, Калмыкия, 2009	Внешняя среда	–	–	I-F mini	1
M1457[VTLH01]	Россия, Калмыкия, 2009	Внешняя среда	–	A1003G (S335G) /int	I-F	2
M-1460*	Россия, Татарстан, 2010	Внешняя среда	–	–	I-E I-F mini	14 1
2403[NEDV01]	Украина, 2011	Больной	–	–	I-E I-F mini	12 0
M-1486*	Россия, Татарстан, 2011	Внешняя среда	–	–	I-E I-F mini	29 1
M-1487*	Россия, Татарстан, 2011	Внешняя среда	–	–	I-E I-F mini	15 0
M1516[VTZY01]	Россия, Калмыкия, 2012	Внешняя среда	–	–	I-F I-C	58 54
M1517[VTZZ01]	Россия, Калмыкия, 2012	Внешняя среда	–	–	I-E	23
M-1525*	Россия, Калмыкия, 2012	Внешняя среда	–	–	I-F mini	10
M1526[VUAA01]	Россия, Калмыкия, 2012	Внешняя среда	–	–	I-F I-C	58 54
29[VUAB01]	Россия, Калмыкия, 2013	Внешняя среда	–	–	I-E	7
M-1543*	Россия, Калмыкия, 2017	Внешняя среда	–	–	I-E I-F mini	29 1
136[VTLK01]	Россия, Калмыкия, 2018	Внешняя среда	–	–	I-E I-F mini	8 3

Примечание. В надстрочном индексе штаммов указан код доступа в NCBI GenBank. *Штаммы, секвенированные в данной работе. «–» — ген(ы) не обнаружен(ы); int — структура гена соответствует референс-штамму *V. cholerae* N16961 O1 El Tor. **Присутствие CRISPR–Cas-системы установлено ранее [20].



Структура CRISPR–Cas-систем изученных *ctxAB⁻tcpA⁻*-штаммов *V. cholerae* O1 El Tor.

а — канонический подтип I-E, присутствующий в штамме *V. cholerae* 29; *б* — подтип I-C штамма *V. cholerae* M1526; *в* — подтип I-F штамма *V. cholerae* 617; *г* — подтип I-F mini штамма *V. cholerae* M1426; *д* — подтип III-B штамма *V. cholerae* M1320. Чёрными вертикальными линиями справа отмечены спейсеры (CRISPR).

ной системе отсутствует ген *cas3*. Два штамма — *V. cholerae* M1320 и 617 — имели тип III, подтип III-B (*cmr1, cas10, cmr3, cmr4, cmr5, cmr6, csx23, cas6f*; таблица, рисунок, *д*).

Нетоксигенные *ctxA⁻tcpA⁻*-штаммы с CRISPR–Cas-системой распространены в России достаточно широко. Данные штаммы выделялись в разные годы на территории республик Татарстан, Дагестан, Башкирия, Мордовия, Калмыкия, а также Астраханской, Саратовской областей и Пермского края (таблица).

Следующий этап работы был посвящён выявлению спейсеров. Они присутствовали практически во всех системах, их количество варьировало от 1 до 80, при этом наибольшее количество спейсеров обнаружено в системе I-E. Исключение составили 4 штамма, содержащие систему I-F mini, в которой спейсеры отсутствовали (таблица). У штамма M-988 из-за некачественной полногеномной нуклеотидной последовательности, представленной в GenBank, достоверно идентифицировать спейсеры не удалось. Выявленные спейсеры были гомологичны протоспейсерным последовательностям ДНК большого количества литических и умеренных фагов, а также плазмид и транспозона *V. cholerae* (фаги: O395, VPUSM 8, K139, K491, K571, K575, VcP032, Kappa, Rostov 7, X29, phi 2, JSF1, JSF2, JSF4, JSF5, JSF6, JSF13, JSF14, JSF17, VMJ710, Rostov M3, CP-T1, 24, vB_VchM-138, vB_VchM_VP-3213, Ch457, E8498, fs1, fs2, Vb_VaM_Valp1, ICP1, VRU, VP24-2_Ke, VMJ710, VcP032, VEJphi, VSK, VSKK, ND1-fs1, KSF-1phi, VGJphi, 1.178.O._10N.286.45.E12, 1.028.O._10N.286.45.B6, 1.159.O._10N.261.46.F12, martha 12B12, jenny 12G5, vB_Vipa26, vB_Vipa10, vB_Vipa4291, vB_Vipa71, vB_VpS_PG07, Zoerhiza.4_15, 13VV501A, 6E35-1b, D481, D483, D485, D491s, D527, VaK; плазмиды: HDW18, pSA7G1, pSA7G2; транспозон Tn7005). Кроме того, обнаружены спейсеры, гомологичные нуклеотидным последовательностям фагов и плазмид представителей рода *Vibrio* (*V. alginolyticus, V. vulnificus, V. parahaemolyticus, V. fluvialis, V. furnissii, V. nigripulchritudo, V. metschnikovii*), а также неродственных видов бактерий (*Klebsiella* spp., *Escherichia* spp., *Salmonella* spp., *Shigella*, *Shewanella algae, Xanthomonas, Stenotrophomonas*). Стоит от-

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-640

метить наличие в некоторых штаммах (*V. cholerae* 102, M1428, M1431, M1443, M1444, M1457, M1460, M1486) спейсеров, идентичных участкам ДНК фага ICP1 (самый распространённый на эндемичных территориях бактериофаг), выделенного в разные годы в Демократической Республике Конго и Бангладеш.

Таким образом, в геноме изученных нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor выявлены следующие антифаговые системы: рестрикции–модификации I типа (*ctxAB*$^-$*tcpA*$^+$), CBASS (*ctxAB*$^-$*tcpA*$^+$ и *ctxAB*$^-$*tcpA*$^-$) и CRISPR-Cas 1-го класса (*ctxAB*$^-$*tcpA*$^-$).

Обсуждение

Учитывая, что нетоксигенные штаммы *V. cholerae* O1 El Tor циркулируют в открытых водоёмах, которые являются и местом обитания различных видов холерных фагов, ожидалось, что в их геноме будет обнаружено большое количество антифаговых систем. Однако в данных штаммах отсутствуют антифаговые острова PLE, BREX и DISARM-системы. У *ctxAB*$^-$*tcpA*$^-$-штаммов не выявлены системы рестрикции–модификации I типа, которые обнаружены в геноме *ctxAB*$^-$*tcpA*$^+$-штаммов. Гены системы CBASS присутствуют у единичных штаммов обеих групп. В то же время 35 изученных клинических и выделенных из водной среды на различных территориях России и сопредельных стран *ctxAB*$^-$*tcpA*$^-$-штаммов содержат CRISPR–Cas-систему 1-го класса типов I и III, которая отсутствует в *ctxAB*$^-$*tcpA*$^+$-изолятах. При этом подтипы I-C и III-B выявлены в единичных штаммах. В то же время 57% штаммов имеют канонический тип системы I-E. Наши данные подтверждают ранее полученные сведения при анализе штаммов, циркулирующих на эндемичной территории, о широком распространении системы I-E среди нетоксигенных штаммов *V. cholerae* [20]. Ряд авторов высказывают предположение о том, что стабильное сохранение структуры системы I-E обусловлено тем, что она расположена на геномном острове GI-24 и перенос её в другие штаммы происходит только в составе указанного мобильного генетического элемента [20, 22]. Некоторые штаммы включали также полноценную систему I-F, которая входит в состав недавно обнаруженного острова патогенности VPI-6 (Vibrio Pathogenicity Island), способного, как и GI-24, целиком вырезаться из хромосомы и переноситься в другие клетки [23]. В то же время бóльшая часть штаммов имела систему I-F mini, у которой рядом с локусами генов *cas* расположен ген *tniQ*, ответственный за продукцию транспозазы. Согласно данным литературы, подобные системы ассоциированы с Tn7-транспозоном [20]. Учитывая отсутствие в данной системе гена *cas3*, кодирующего хеликазу-нуклеазу, можно предположить, что I-F mini является нефункциональной.

Поскольку новые спейсеры внедряются преимущественно в 5’-области системы, CRISPR представляет собой хронологическую запись взаимодействия бактерии с мобильными генетическими элементами. В связи с этим наличие у ряда штаммов спейсеров, гомологичных генетическому материалу фага ICP1, циркулирующему на эндемичных территориях, может указывать на завозной характер данных штаммов. Также очевидно, что, защищая *V. cholerae* от хищничества холерных фагов, а также фагов других бактерий, CRISPR–Cas-система повышает выживаемость нетоксигенных штаммов во внешней среде. Возможно, её присутствие является одним из механизмов длительной циркуляции нетоксигенных штаммов в воде открытых водоёмов.

Таким образом, изученные нетоксигенные *ctxAB*$^-$*tcpA*$^+$- и *ctxAB*$^-$*tcpA*$^-$-штаммы *V. cholerae* O1 El Tor, выделяемые на территории России и сопредельных стран, лишены ряда мобильных генетических элементов с антифаговыми локусами (острова PLE, ICE SXT элементы с системами BREX и DISARM). В то же время в геноме *ctxAB*$^-$*tcpA*$^+$-штаммов выявлена система рестрикции–модификации I типа, у одного штамма — CBASS (*ctxAB*$^-$*tcpA*$^+$ и *ctxAB*$^-$*tcpA*$^-$) и CRISPR–Cas 1-го класса (*ctxAB*$^-$*tcpA*$^-$).

Заключение

В результате проведённых исследований установлена гетерогенность изученных нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor, циркулирующих на территории России и сопредельных стран, по наличию антифаговых систем, расположенных на мобильных генетических элементах, что расширяет сведения об их генетической организации. Установлено, что 80% изученных *ctxAB*$^-$*tcpA*$^+$-штаммов содержат систему рестрикции–модификации I типа, которая не обнаружена у *ctxAB*$^-$*tcpA*$^-$-штаммов. Единичные штаммы (1 *ctxAB*$^-$*tcpA*$^+$ и 3 *ctxAB*$^-$*tcpA*$^-$) имеют систему CBASS, при этом у *ctxAB*$^-$*tcpA*$^+$-изолята она является интактной и соответствует токсигенному референс-штаммму *V. cholerae* N16961 O1 El Tor. В геноме 32% исследованных *ctxAB*$^-$*tcpA*$^-$-штаммов выявлена CRISPR–Cas-система 1-го класса типов I (подтипов I-E, I-F, I-F mini, I-C) и III (подтип III-B), отсутствующая у *ctxAB*$^-$*tcpA*$^+$-штаммов. При этом наиболее распространённой (57%) является каноническая система подтипа I-E. Присутствие нескольких типов и подтипов CRISPR–Cas-системы в геноме ряда штаммов может указывать на её неоднократное приобретение данными изолятами посредством горизонтального переноса. Анализ спейсеров в CRISPR-кассете позволяет выявлять нетоксигенные штаммы *V. cholerae* O1 El Tor, завезённые с эндемичных по холере территорий.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Смирнова Н.И., Кульшань Т.А., Баранихина Е.Ю. и др. Структура генома и происхождение нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор с различной эпидемиологической значимостью. *Генетика*. 2016;52(9):1029–41. DOI: https://doi.org/10.7868/S0016675816060126 EDN: https://elibrary.ru/wlnekj
Smirnova N.I., Kul'shan' T.A., Baranikhina E.Y., et al. Genome structure and origin of nontoxigenic strains of *Vibrio cholerae* of El Tor biovar with different epidemiological significance. *Genetics*. 2016; 52(9): 1029–41. DOI: https://doi.org/10.1134/S1022795416060120 EDN: https://elibrary.ru/xfheir
2. Кругликов В.Д., Левченко Д.А., Титова С.В. и др. Холерные вибрионы в водоёмах Российской Федерации. *Гигиена и санитария*. 2019;98(4):393–9. Kruglikov V.D., Levchenko D.A., Titova S.V., et al. Vibrio cholerae in the waters of the Russian Federation. *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2019;98(4):393–9. EDN: https://elibrary.ru/dfqoan
3. Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Гаевская Н.Е. и др. Фено- и генотипические особенности нетоксигенных штаммов холерных вибрионов различного происхождения, изолированных на территории России. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020;(3):89–96. Levchenko D.A., Kruglikov V.D., Gaevskaya N.E., et al. Pheno- and genotypical features of non-toxigenic strains of cholera vibrios of different origins, isolated in the territory of Russia. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2020;(3):89–96. DOI: https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-3-89-96 EDN: https://elibrary.ru/rvjkhr
4. Миронова Л.В., Бочалгин Н.О., Гладких А.С. и др. Филогенетическое положение и особенности структуры геномов ctxAB–tcpA+ *Vibrio cholerae* из поверхностных водоемов на неэндемичной по холере территории. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2020;(1):115–23. Mironova L.V., Bochalgin N.O., Gladkikh A.S., et al. Phylogenetic affinity and genome structure features of ctxAB–tcpA+ *Vibrio cholerae* from the surface water bodies in the territory that is non-endemic as regards cholera. *Problems of Particularly Dangerous Infections.* 2020;(1):115–23. DOI: https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-1-115-123 EDN: https://elibrary.ru/uubigv
5. Монахова Е.В., Носков А.К., Кругликов В.Д. и др. Генотипическая характеристика клональных комплексов CTX–VPI+ *Vibrio cholerae* O1, обнаруживаемых в водоемах Ростовской области. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2023;(3):99–107. Monakhova E.V., Noskov A.K., Kruglikov V.D., et al. Genotypic characteristics of CTX–VPI^{+} clonal complexes of *Vibrio cholerae* O1 found in water bodies of the Rostov region. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2023;(3):99–107. DOI: https://doi.org/10.21055/0370-1069-2023-3-99-107
6. Носков А.К., Кругликов В.Д., Москвитина Э.А. и др. Холера: анализ и оценка эпидемиологической обстановки в мире и России. Прогноз на 2023 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023;(1):56–66. Noskov A.K., Kruglikov V.D., Moskvitina E.A., et al. Cholera: analysis and assessment of epidemiological situation around the world and in Russia (2013–2022). Forecast for 2023. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2023;(1):56–66. DOI: https://doi.org/10.21055/0370-1069-2023-1-56-66 EDN: https://elibrary.ru/hzasbo
7. Попова А.Ю., Носков А.К., Ежлова Е.Б. и др. Эпидемиологическая ситуация по холере в Российской Федерации в 2023 г. и прогноз на 2024 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2024;(1):76–88. Popova A.Yu., Noskov A.K., Ezhlova E.B., et al. Epidemiological situation on cholera in the Russian Federation in 2023 and forecast for 2024. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2024;(1):76–88. DOI: https://doi.org/10.21055/0370-1069-2024-1-76-88 EDN: https://elibrary.ru/ipvmuo
8. Агафонова Е.Ю., Смирнова Н.И., Альхова Ж.В. и др. Нетоксигенные штаммы *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор, выделенные на территории России: молекулярно-генетические особенности и патогенные свойства. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2019;96(2):13–24. Agafonova E.Yu., Smirnova N.I., Alkhova Zh.V., et al. On-toxigenic strains of *Vibrio cholerae* biovar El Tor, isolated in the territory of Russia: molecular-genetic peculiarities and pathogenic properties. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2019;96(2):13–24. DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-2-13-24 EDN: https://elibrary.ru/yijsem
9. Faruque S.M., Mekalanos J.J. Phage-bacterial interactions in the evolution of toxigenic *Vibrio cholerae. Virulence*. 2012;3(7):556–65. DOI: https://doi.org/10.4161/viru.22351
10. Angermeyer A., Hays S.G., Nguyen M.H.T., et al. Evolutionary sweeps of subviral parasites and their phage host bring unique parasite variants and disappearance of a phage CRISPR-Cas system. *mBio*. 2022;13(1):e03088-21. DOI: https://doi.org/10.1128/mbio.03088-21
11. Tumban E., ed. *Bacteriophages. Methods and Protocols*. New York: Humana Press; 2024.
12. Jermyn W.S., Boyd E.F. Characterization of a novel Vibrio pathogenicity island (VPI-2) encoding neuraminidase (nanH) among toxigenic *Vibrio cholerae* isolates. *Microbiology*. 2002;148(Pt. 11):3681–93. DOI: https://doi.org/10.1099/00221287-148-11-3681
13. Labrie S.J., Samson J.E., Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010;8(5):317–27. DOI: https://doi.org/10.1038/nrmicro2315
14. Brenzinger S., Airoldi M., Ogunleye A.J., et al. The *Vibrio cholerae* CBASS phage defence system modulates resistance and killing by antifolate antibiotics. *Nat. Microbiol*. 2024;9(1):251–62. DOI: https://doi.org/10.1038/s41564-023-01556-y
15. LeGault K.N., Hays S.G., Angermeyer A., et al. Temporal shifts in antibiotic resistance elements govern phage-pathogen conflicts. *Science.* 2021;373(6554):eabg2166. DOI: https://doi.org/10.1126/science.abg2166
16. Заднова С.П., Плеханов Н.А., Спирина А.Ю., Челдышова Н.Б. Анализ антифаговых систем в штаммах *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор. *Здоровье населения и среда обитания – ЗНиСО.* 2023;31(11):94–100. Zadnova S.P., Plekhanov N.A., Spirina A.Yu., Cheldyshova N.B. Analysis of Antiphage Systems in *Vibrio cholerae* O1 El Tor Biotype Strains. *Public Health and Life Environment – PH&LE.* 2023;31(11):94–100. DOI: https://doi.org/10.35627/2219-5238/2023-31-11-94-100 EDN: https://elibrary.ru/miocic
17. O'Hara B.J., Barth Z.K., McKitterick A.C., Seed K.D. A highly specific phage defense system is a conserved feature of the *Vibrio cholerae* mobilome. *PLoS Genet*. 2017;13(6):e1006838. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006838
18. McKitterick A.C., Seed K.D. Anti-phage islands force their target phage to directly mediate island excision and spread. *Nat. Commun*. 2018;9(1):2348. DOI: https://doi.org/10.1038/s41467-018-04786-5
19. Barth Z.K., Silvas T.V., Angermeyer A., Seed K.D. Genome replication dynamics of a bacteriophage and its satellite reveal strategies for parasitism and viral restriction. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(1): 249–63. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gkz1005
20. McDonald N.D., Regmi A., Morreale D.P., et al. CRISPR-Cas systems are present predominantly on mobile genetic elements in Vibrio species. *BMC Genomics*. 2019;20(1):105. DOI: https://doi.org/10.1186/s12864-019-5439-1
21. Makarova K.S., Wolf Y.I., Iranzo J., et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived

variants. *Nat. Rev. Microbiol*. 2020;18(2):67–83. DOI: https://doi.org/10.1038/s41579-019-0299-x

22. Chakraborty S., Waise T.M., Hassan F., et al. Assessment of the evolutionary origin and possibility of CRISPR-Cas (CASS) mediated RNA interference pathway in *Vibrio cholerae* O395. *In Silico Biol*. 2009;9(4):245–54.
23. Carpenter M.R., Kalburge S.S., Borowski J.D., et al. CRISPR-Cas and contact-dependent secretion systems present on excisable pathogenicity islands with conserved recombination modules. *J. Bacteriol*. 2017;199(10):e00842-16. DOI: https://doi.org/10.1128/jb.00842-16

Информация об авторах

Заднова Светлана Петровна — д-р биол. наук, в. н. с., зав. лаб. патогенных вибрионов отдела микробиологии Российского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия, svetlanazadnova@mail.ru, https://orcid.org/0000-0003-4366-0562

Плеханов Никита Александрович — канд. биол. наук, с. н. с. лаб. патогенных вибрионов отдела микробиологии Российского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия, muscari.sp@icloud.com, https://orcid.org/0000-0002-2355-7018

Сергутин Данил Александрович✉ — лаборант-исследователь лаб. патогенных вибрионов отдела микробиологии Российского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия, sergutin322@mail.ru, https://orcid.org/0009-0003-7525-9682

Челдышова Надежда Борисовна — канд. мед. наук, с. н. с. лаб. патогенных вибрионов отдела микробиологии Российского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия, rusrapi@microbe.ru, https://orcid.org/0000-0001-5759-3765

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

Краснов Ярослав Михайлович — канд. хим. наук, зав. лаб. геномного и протеомного анализа отдела микробиологии Российского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия, rusrapi@microbe.ru, https://orcid.org/0000-0002-4909-2394

Участие авторов: *Заднова С.П.* — формирование идеи, разработка концепции и дизайна исследования, оформление статьи, утверждение окончательного варианта; *Плеханов Н.А.* — существенный вклад в проведение исследования, анализ полученных данных, редактирование текста статьи; *Сергутин Д.А.* — проведение исследования, интерпретация полученных данных; *Челдышова Н.Б.* — проведение исследования; *Федоров А.В.*, *Краснов Я.М.* — секвенирование, сборка и аннотация геномов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 09.06.2025;
принята к публикации 19.08.2025;
опубликована 28.08.2025

Information about the authors

Svetlana P. Zadnova — Dr. Sci. (Biol.), leading researcher, Head, Laboratory of pathogenic vibrios, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russia, svetlanazadnova@mail.ru, https://orcid.org/0000-0003-4366-0562

Nikita A. Plekhanov — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of pathogenic vibrios, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russia, muscari.sp@icloud.com, https://orcid.org/0000-0002-2355-7018

Danil A. Sergutin✉ — laboratory assistant, Laboratory of pathogenic vibrios, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russia, sergutin322@mail.ru, https://orcid.org/0009-0003-7525-9682

Nadezhda B. Cheldyshova — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of pathogenic vibrios, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russia, rusrapi@microbe.ru, https://orcid.org/0000-0001-5759-3765

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

Yaroslav M. Krasnov — Cand. Sci. (Chem.), Head, Laboratory of genomic and proteomic analysis, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russia, rusrapi@microbe.ru, https://orcid.org/0000-0002-4909-2394

Author contribution: *Zadnova S.P.* — formation of the idea, development of the concept and design of the study, preparation of the article, approval of the final version; *Plekhanov N.A.* — significant contribution to the study, analysis of the obtained data, editing the text of the article; *Sergutin D.A.* — conducting the study, interpretation of the obtained data; *Cheldyshova N.B.* — conducting the study; *Fedorov A.V., Krasnov Ya.M.* — sequencing, assembly and annotation of genomes. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a substantial contribution to the conception of the article, acquisition, analysis, interpretation of data for the article, drafting and revising the article, final approval of the version to be published.

The article was submitted 09.06.2025;
accepted for publication 19.08.2025;
published 28.08.2025

Оригинальное исследование
https://doi.org/10.36233/0372-9311-710

Детерминанты резистентности к левофлоксацину и метронидазолу российских клинических изолятов *Helicobacter pylori* по результатам полногеномного секвенирования

Старкова Д.А.[1]✉, Гладышев Н.С.[2], Полев Д.Е.[1], Саитова А.Т.[1], Глазунова К.А.[3], Егорова С.А.[1], Сварваль А.В.[1]

[1]Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
[2]Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына Российского научного центра хирургии имени академика Б.В. Петровского, Москва, Россия;
[3]Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация

Введение. Устойчивость к антибактериальным препаратам является одной из ключевых проблем в лечении *Helicobacter pylori*-инфекции, однако в России практически отсутствуют данные о механизмах резистентности к метронидазолу (MTZ) и левофлоксацину (LVX).

Цель работы — выявление детерминант резистентности у клинических изолятов *H. pylori* к MTZ и LVX с использованием данных полногеномного секвенирования.

Материалы и методы. Проведён ретроспективный анализ 43 изолятов *H. pylori*, выделенных от взрослых пациентов (2014–2022 гг.). Чувствительность к антибактериальным препаратам определяли бактериологическим диско-диффузионным методом. Полногеномное секвенирование 43 штаммов *H. pylori* проводили с использованием секвенатора «DNBSEQ-G50».

Результаты. Оценка результатов теста фенотипической лекарственной чувствительности показала, что 11 изолятов являлись чувствительными к MTZ (MTZ-S), 31 — чувствительными к LVX (LVX-S), тогда как 32 изолята проявляли устойчивость к MTZ (MTZ-R), 12 — к LVX (LVX-R). Для выявления ассоциации между фенотипической и генотипической устойчивостью проведён анализ нуклеотидных замен в генах *gyrA*, *gyrB*, *rdxA*, *frxA*, *fdxB*, *fur*. Из всех мутаций, выявленных в генах *gyrA* и *gyrB*, только *D91/GNY* в гене *gyrA* была ассоциирована с фенотипической устойчивостью к LVX и обнаружена у 4/12 (33,3%) изолятов ($p < 0,05$). Комбинированная мутация *D91G/N/Y+N87K* в гене *gyrA* выявлена у 6/12 (50,0%) LVX-R-изолятов ($p < 0,001$). У 21,9% (7/32) MTZ-R-изолятов в гене *rdxA* выявлены точечные мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания или преждевременной терминации синтеза белка. Ни одна из мутаций в генах *frxA*, *fur* и *fdxB* не была ассоциирована с устойчивостью *H. pylori* к MTZ.

Выводы. По результатам полногеномного секвенирования российских клинических изолятов *H. pylori* детекция комбинированной мутации *D91G/N/Y+N87K* в гене *gyrA* может служить предиктором фенотипической устойчивости *H. pylori* к LVX.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori, полногеномное секвенирование, устойчивость к антибактериальным препаратам, детерминанты резистентности, метронидазол, левофлоксацин*

Этическое утверждение. Исследование проведено с соблюдением строгих норм конфиденциальности: все данные пациентов деперсонифицированы и зашифрованы. От каждого участника исследования получено информированное согласие. Протокол исследования одобрен независимым локальным этическим комитетом НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (протокол № 50/04–2019 от 22.06.2020).

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: Старкова Д.А., Гладышев Н.С., Полев Д.Е., Саитова А.Т., Глазунова К.А., Егорова С.А., Сварваль А.В. Детерминанты резистентности к левофлоксацину и метронидазолу российских клинических изолятов *Helicobacter pylori* по результатам полногеномного секвенирования. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2025;102(4):465–473.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-710
EDN: https://www.elibrary.ru/YYLGLL

© Старкова Д.А., Гладышев Н.С., Полев Д.Е., Саитова А.Т., Глазунова К.А., Егорова С.А., Сварваль А.В., 2025

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-710
ORIGINAL RESEARCHES

Original Study Article
https://doi.org/10.36233/0372-9311-701

Determinants of resistance to levofloxacin and metronidazole in Russian *Helicobacter pylori* clinical isolates based on whole-genome sequencing data

Daria A. Starkova[1]✉, Nikita S. Gladyshev[2], Dmitrii E. Polev[1], Alina T. Saitova[1], Ksenia A. Glazunova[3], Svetlana A. Egorova[1], Alena V. Svarval[1]

[1]St. Petersburg Pasteur institute, St. Petersburg, Russia;
[2]Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russia;
[3]Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

Abstract

Introduction. Helicobacter pylori infection, however, data on the mechanisms of metronidazole (MTZ) and levofloxacin (LVX) resistance in Russia remain scarce. and levofloxacin (LVX) in Russia.

The aim of the study is to identify the determinants of resistance in clinical isolates of *H. pylori* to MTZ and LVX using whole-genome sequencing data.

Materials and methods. A retrospective analysis of 43 *H. pylori* isolates obtained from adult patients (2014–2022) was conducted. Susceptibility to antibiotics was determined using the bacteriological disk diffusion method. Whole-genome sequencing of 43 *H. pylori* strains was performed using a DNBSEQ-G50 sequencer.

Results. The evaluation of the phenotypic drug susceptibility test results showed that 11 isolates were susceptible to MTZ (MTZ-S), 31 were susceptible to LVX (LVX-S), while 32 isolates were resistant to MTZ (MTZ-R), and 12 were resistant to LVX (LVX-R). To identify the association between phenotypic and genotypic resistance, an analysis of nucleotide substitutions in the *gyrA, gyrB, rdxA, frxA, fdxB* and *fur* genes was conducted. Of all the mutations identified in the *gyrA* and *gyrB* genes, only *D91/GNY* in the *gyrA* gene was associated with phenotypic resistance to LVX and was found in 4/12 (33.3%) of the isolates ($p < 0.05$). The combined mutation *D91G/N/Y+N87K* in the *gyrA* gene was detected in 6/12 (50.0%) of LVX-R isolates ($p < 0.001$). Point mutations in the *rdxA* gene were detected in 21.9% (7/32) of MTZ-R isolates, leading to a frameshift or premature termination of protein synthesis. None of the mutations in the *frxA*, *fur* and *fdxB* genes were associated with *H. pylori* resistance to MTZ.

Conclusion. Based on the results of whole-genome sequencing of Russian clinical isolates of *H. pylori*, the detection of the combined mutation *D91G/N/Y+N87K* in the *gyrA* gene can serve as a predictor of the phenotypic resistance of *H. pylori* to levofloxacin.

Keywords: *Helicobacter pylori, whole-genome sequencing, antibiotic resistance, resistance determinants, metronidazole, levofloxacin*

Ethics approval. The study was conducted in strict compliance with confidentiality standards: all patient data was made anonymous and encrypted. Informed consent was obtained from each study participant. The study protocol was approved by the Independent Local Ethics Committee of the Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology (protocol No. 50/04–2019 dated June 22, 2020).

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

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

For citation: Starkova D.A., Gladyshev N.S., Polev D.E., Saitova A.T., Glazunova K.A., Egorova S.A., Svarval A.V. Determinants of resistance to levofloxacin and metronidazole in Russian *Helicobacter pylori* clinical isolates based on whole-genome sequencing data. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2025;102(4):465–473.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-710
EDN: https://www.elibrary.ru/YYLGLL

Введение

Инфекция *Helicobacter pylori* остаётся одной из самых распространённых хронических бактериальных инфекций в мире и считается основным фактором риска развития рака желудка (около 90% случаев) [1]. Согласно ключевым положениям Маастрихт VI/Флорентийского консенсуса, лежащего в основе национальных клинических рекомендаций, инфекция *H. pylori* (независимо от симптомов или осложнений) всегда вызывает гастрит, единственным методом лечения которого является эрадикационная терапия. Кроме того, согласно первому положению, для рационального использования антибиотиков целесообразно проводить тесты на

© Starkova D.A., Gladyshev N.S., Polev D.E., Saitova A.T., Glazunova K.A., Egorova S.A., Svarval A.V., 2025

лекарственную чувствительность до назначения терапии 1-й линии [2, 3].

Устойчивость *H. pylori* к антибактериальным препаратам (АБП) признана на сегодняшний день одной из самых серьёзных проблем. Для эрадикации *H. pylori* используется комбинированная терапия, состоящая из 2–3 АБП: амоксициллин, кларитромицин, метронидазол (MTZ), тетрациклин, левофлоксацин (LVX), рифабутин; ингибитора протонной помпы и препаратов висмута (или без него) [2, 3]. Однако в последние годы наблюдается неуклонное снижение уровня эффективности антихеликобактерной терапии параллельно с развивающейся устойчивостью к противомикробным препаратам [4, 5]. Более того, широкое применение АБП или низкий уровень комплаенса при лечении приводят к развитию устойчивости не только *H. pylori*, но и других бактерий микробиома желудочно-кишечного тракта, способствуя селективному давлению АБП в сторону отбора генов резистентности, обогащению резистома и распространению среди бактериальных сообществ [6, 7].

Молекулярно-генетические механизмы, лежащие в основе развития антибиотикорезистентности (АБР) *H. pylori*, полностью не изучены. Принято считать, что устойчивость *H. pylori* к АБП обусловлена мутациями в хромосомной ДНК *de novo*, которые либо изменяют мишень действия АБП, либо препятствуют его активации внутри клеток [6]. Тем не менее у значительной доли штаммов *H. pylori*, устойчивых к АБП, отсутствуют известные генетические детерминанты резистентности. Это указывает на сложный и многофакторный характер механизмов устойчивости, выходящий за рамки мутационной активности и/или активации отдельных генов в ответ на применение АБП. К потенциальным механизмам устойчивости *H. pylori* относят:

- повышенную экспрессию генов системы эффлюкса;
- синергетические взаимодействия, включающие мутации, горизонтальный перенос генов и активацию защитных систем;
- клеточную адаптацию, связанную с образованием биопленок и коккоидов, устойчивых к АБП;
- компенсаторные мутации, нейтрализующие снижение фитнеса устойчивых штаммов за счёт эпистатического взаимодействия с детерминантами резистентности;
- гетерорезистентность — феномен, при котором в бактериальной популяции одновременно присутствуют субпопуляции клеток с разной чувствительностью к АБП.

Все перечисленные механизмы не только способствуют формированию АБР *H. pylori*, но и ускоряют развитие полирезистентности, что существенно усложняет процесс эрадикации и подчёркивает необходимость постоянного пересмотра и усовершенствования терапевтических подходов [6–8].

Механизм действия MTZ — препарата 1-й линии эрадикационной терапии *H. pylori* — заключается в восстановлении нитрогруппы в анаэробных условиях, что приводит к образованию цитотоксичных нитроанионов и свободных радикалов, повреждающих ДНК и нарушающих функционирование бактериальных клеток. Устойчивость *H. pylori* к MTZ обусловлена совокупностью сложных генетических и биохимических процессов, которые до настоящего времени полностью не изучены. Основной механизм резистентности к MTZ опосредован инактивацией генов ферментов редуктаз rdxA (кодирует нечувствительную к кислороду нитроредуктазу) и frxA (кодирует флавиноксидазу), что снижает способность MTZ восстанавливаться до активных форм (NO_2^- и NO_2^{2-}) и, как следствие, уменьшает антимикробное действие препарата [9, 10]. Мутации в гене *fur*, регулирующем захват железа, и *fdxB*, кодирующем ферредоксин, предположительно также могут способствовать формированию АБР [7, 8, 10]. Повышение уровня антиоксидантных ферментов и системы эффлюкса, а также мутационной активности в генах, ответственных за репарацию повреждённой ДНК, выступают в роли дополнительных факторов, способствующих развитию резистентности *H. pylori* к MTZ [6].

Другой препарат, выступающий в качестве резервной терапии для лечения хеликобактериоза, — LVX — оказывает антибактериальный эффект за счёт ингибирования топоизомеразы II (ДНК-гиразы) и топоизомеразы IV — ключевых ферментов, участвующих в процессах репликации и рекомбинации ДНК. Наиболее распространённый механизм резистентности *H. pylori* к фторхинолонам обусловлен точечными мутациями в области QRDR (Quinolone Resistance-Determining Regions), определяющей резистентность к хинолонам: мутации в кодонах 86, 87, 88, 91, 97 гена *gyrA* и кодонах 481, 484 и 463 гена *gyrB* [6, 7, 10]. Однако роль некоторых из перечисленных мутаций в развитии устойчивости *H. pylori* к LVX не доказана.

В России практически отсутствуют систематизированные и достоверные данные о распространённости устойчивости *H. pylori* к LVX и MTZ. Кроме того, исследований, посвящённых выявлению генетических детерминант резистентности к данным АБП, практически нет, что затрудняет разработку эффективных молекулярно-генетических методов диагностики и мониторинга резистентности в клинической практике.

Целью нашего исследования явилось выявление детерминант резистентности у клинических изолятов *H. pylori* к MTZ и LVX с использованием данных полногеномного секвенирования.

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-710
ORIGINAL RESEARCHES

Материалы и методы

Проведён ретроспективный анализ 43 клинических изолятов *H. pylori*, выделенных от взрослых пациентов с заболеваниями желудочно-кишечного тракта (2014–2022 гг.) в Санкт-Петербургском научно-исследовательском институте эпидемиологии и микробиологии им. Пастера. Средний возраст пациентов составлял 44,0 ± 4,5 года (22–70 лет).

Биоптаты слизистой оболочки антрального отдела и/или дна желудка, помещённые в тиогликолевую среду, подлежали гомогенизации и последующему культивированию на селективной среде на основе Колумбийского агара с добавлением 7% дефибринированной лошадиной крови и 1% раствора IsoVitalex при 37°C в микроаэрофильных условиях (содержание кислорода ~ 5%) с использованием газогенерирующих пакетов GasPak 100 (BBL CampyPak Plus Microaerophilic System envelopes with Palladium Catalyst, «BD Biosciences»). Для идентификации *H. pylori* использовали набор биохимических тестов (уреазный, каталазный и оксидазный) и набор реагентов для выявления ДНК *H. pylori* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) («ДНК-Технология»).

Для постановки теста лекарственной чувствительности бактериальную культуру *H. pylori* суспендировали до плотности 2 по стандарту мутности Мак-Фарланда (~ 6×10^8 КОЕ/мл), наносили 0,1 мл на поверхность чашки Петри с агаром Мюллера–Хинтона с добавлением 5% дефибринированной лошадиной крови и равномерно распределяли по поверхности шпателем. Чувствительность изолятов *H. pylori* к MTZ и LVX определяли диско-диффузионным методом: сразу после инокуляции на поверхность агара асептически наносили диски с MTZ (5 мкг/диск) и LVX (5 мкг/диск) инкубировали в микроаэрофильных условиях (5% O_2, 10% CO_2, 85% N_2) при 37°C в течение 72 ч. После окончания инкубации измеряли диаметр зон полного подавления роста вокруг диска с антибиотиком (мм). Интерпретацию результатов диско-диффузионного метода проводили на основании пороговых значений, представленных в публикации Z. Zhong и соавт.: штаммы *H. pylori* считались устойчивыми к MTZ (MTZ-R) при диаметре зоны ингибиции ≤ 16 мм, чувствительными (MTZ-S) при диаметре ≥ 17 мм; устойчивыми к LVX (LVX-R) — при диаметре зоны ингибиции ≤ 17 мм, чувствительными (LVX-S) — при диаметре ≥ 18 мм [11].

Хромосомную ДНК из чистых культур *H. pylori* выделяли с помощью набора «QIAamp DNA Mini Kit» («QIAGEN GmbH») в соответствии с инструкцией производителя. Концентрация ДНК каждого образца была количественно определена на флуориметре «Qubit 4.0». Полногеномное секвенирование проводили на секвенаторе «DNBSEQ-G50» («MGI Tech Co. Ltd.»).

Оценку качества парно-концевых библиотек, удаление адаптеров и последовательностей низкого качества (Q-score < 20) проводили с помощью программ «FastQC v. 0.12.1» и «Trim Galore! v. 0.6.7». Бактериальные геномы были собраны *de novo* с помощью геномного ассемблера «SPAdes v. 3.13.1», а результаты были оценены с помощью «QUAST v. 5.2.0» [12, 13]. Полученные геномные последовательности были выровнены на последовательность референсного штамма *H. pylori* 26695 (GenBank acc. no. AE000511.1). Для оценки генетических вариаций между изолятами и выявления нуклеотидных замен использовали программу «Snippy v. 4.6.0»[1]. Выровненные нуклеотидные последовательности были визуально проанализированы с помощью «UGENE v. 38.1» [14]. Все сборки геномов клинических изолятов *H. pylori* были депонированы в базу данных NCBI GenBank под регистрационным номером PRJNA1011037[2].

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием языка программирования R v. 4.3.2. Наличие корреляции между двумя группами (фенотипической и генотипической) выявляли с использованием критерия χ^2 и точного критерия Фишера. Различия между группами считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Анализ теста фенотипической лекарственной чувствительности показал, что среди 43 клинических изолятов *H. pylori* 12 проявляли устойчивость к LVX (LVX-R), 32 — к MTZ (MTZ-R); в то же время 31 изолят был чувствителен к LVX (LVX-S), 11 — к MTZ (MTZ-S). Среди резистентных изолятов 9 проявляли устойчивость одновременно к обоим препаратам (группа ***A***), тогда как среди чувствительных изолятов 8 были чувствительны как к LVX, так и к MTZ (группа ***B***: **рисунок**).

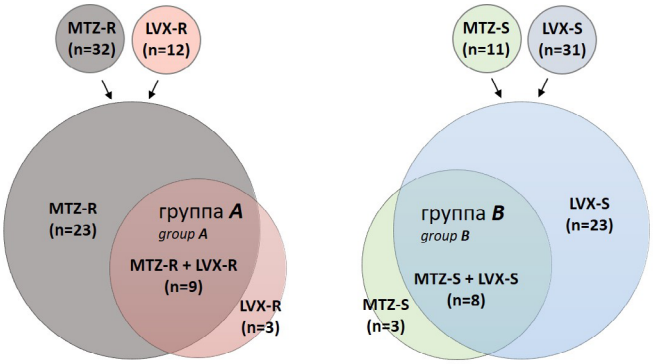


Диаграмма Венна, отображающая комбинации статусов фенотипической лекарственной чувствительности клинических изолятов *H. pylori* к MTZ и LVX.

[1] URL: https://github.com/tseemann/snippy
[2] URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA1011037

Для поиска детерминант резистентности к LVX и MTZ и их ассоциации с фенотипической устойчивостью все 43 изолята были подвергнуты полногеномному секвенированию, после чего проведён анализ нуклеотидных замен в генах *gyrA*, *gyrB*, *rdxA*, *frxA*, *fdxB* и *fur*.

Из всех мутаций в гене *gyrA* только *D91N/Y/G* была ассоциирована с фенотипической лекарственной устойчивостью и выявлена у 33,3% (4/12) LVX-R-изолятов ($p < 0,05$) (**таблица**). Миссенс-мутация *N87K* в гене *gyrA* выявлена у 16,7% (2/12) LVX-R-изолятов и не встречалась в сочетании с мутациями *D91N/Y/G* и *A88P*, тогда как мутация *A88P* выявлена лишь у 1 (8,3%) устойчивого штамма в сочетании с мутацией *D91N*. С учётом отсутствия указанных мутаций у LVX-S-изолятов, комбинированная мутация *D91N/Y/G+N87K* значимо ассоциирована с устойчивостью клинических изолятов и выявлена у 50,0% (6/12) LVX-R-изолятов ($p < 0,001$). Следует отметить, что мутации *D91N/Y/G*, *N87K* и *A88P* в гене *gyrA* были обнаружены исключительно у изолятов, входящих в группу *A*, и отсут-

Мутации в генах устойчивости к LVX и MTZ у клинических изолятов *H. pylori* по сравнению с геномом референсного штамма *H. pylori* 26695, *n* (%)

Ген (локус)	Аминокислотная замена	LVX-R (*n* = 12)	LVX-S (*n* = 31)	MTZ-R (*n* = 32)	MTZ-S (*n* = 11)	*p*
gyrA (HP_0701)	*D91N/Y/G*	4 (33,3)	0			0,0040
	N87K	2 (16,7)	0			0,0730
	A88P	1 (8,3)	0			0,2790
gyrB (HP_0501)	*D481E*	3 (25,0)	8 (25,8)			~ 1,0000
	R484K	3 (25,0)	8 (25,8)			~ 1,0000
rdxA (HP_0954)	*S108A/P*			7 (21,9)	0	0,1628
	R16C			7 (21,9)	0	0,1628
	L62V			6 (18,7)	0	0,3122
	Ter211R_ext stop lost & splice region*			1 (3,1)	0	~ 1,0000
	*Q50*stop*			1 (3,1)	0	~ 1,0000
	*W52*stop*			1 (3,1)	0	~ 1,0000
	H97fs			1 (3,1)	0	~ 1,0000
	S43fs			1 (3,1)	0	~ 1,0000
	I182fs			1 (3,1)	0	~ 1,0000
	M120fs			1 (3,1)	0	~ 1,0000
	R131K			12 (37,5)	1 (9,1)	0,1290
	T31E			13 (40,6)	5 (45,4)	0,7794
	D59N			30 (93,7)	9 (81,8)	0,2665
frxA (HP_0642)	*K18fs*			17 (53,1)	5 (45,4)	0,6606
	Y19fs			1 (3,1)	0	~ 1,0000
	*Q27*stop*			1 (3,1)	0	~ 1,0000
	R23fs			1 (3,1)	0	~ 1,0000
	I44fs			1 (3,1)	0	~ 1,0000
	A70fs			1 (3,1)	0	~ 1,0000
	R106fs			1 (3,1)	1 (9,1)	0,4507
	*W137*stop*			1 (3,1)	0	~ 1,0000
	*Q141*stop*			1 (3,1)	0	~ 1,0000
	V215fs			10 (31,2)	6 (54,5)	0,1679
fdxB (HP_1508)	*N424fs*			1 (3,1)	1 (9,1)	0,4507
	K426fs			1 (3,1)	1 (9,1)	0,4507
fur (HP_1027)	*C150Y*			3 (9,4)	2 (18,2)	0,5890
	N118Q			7 (21,9)	3 (27,3)	0,6982

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-710

ствовали у монорезистентных изолятов. Все мутации в гене *gyrB* присутствовали у изолятов *H. pylori* независимо от их фенотипической устойчивости ($p > 0,05$). Мутации в позициях 86, 97 гена *gyrA* и 463 гена *gyrB*, предположительно ассоциированные с резистентностью *H. pylori* к LVX, в нашей выборке не обнаружены.

Всего в гене *rdxA* выявлено 56 точечных мутаций, из которых 4 (*H97fs*, *S43fs*, *I182fs*, *M120fs*) относились к мутациям, приводящим к сдвигу рамки считывания (frameshift, fs), 2 (*Q50*stop*, *W52*stop*) — к преждевременной терминации рамки считывания, *Ter211R_ext** — к потере стоп-кодона и слиянию *rdxA* с соседним геном *HP_0953*. Две мутации (*S108A/P*, *L62V*) выявлены нами впервые у MTZ-R-изолятов и отсутствовали у MTZ-S-изолятов, однако без ассоциации с фенотипической устойчивостью ($p > 0,05$). Мутации *R131K*, *T31E* и *D59N* обнаружены у изолятов *H. pylori* в 2 фенотипических группах и не связаны с фенотипической устойчивостью к MTZ.

В гене *frxA* нами выявлены 7 мутаций, приводящих к сдвигу рамки считывания, из которых 4 (*Y19fs*, *R23fs*, *I44fs*, *A70fs*) присутствовали в геноме только MTZ-R-изолятов, 3 (*K18fs*, *R106fs*, *V215fs*) выявлены у изолятов обеих фенотипических групп. В то же время 3 нонсенс-мутации, приводящие к преждевременной терминации белка, обнаружены исключительно в геномах MTZ-R-штаммов (таблица). В гене *fdxB* 2 мутации (*N424fs*, *K426fs*) присутствовали в геноме как MTZ-R-, так и MTZ-S-изолятов. Ни одна из миссенс-мутаций в генах *frxA* и *fdxB* не была ассоциирована с фенотипической устойчивостью к MTZ.

Всего в гене *fur* выявлено 12 миссенс-мутаций, из которых *C150Y* и *N118Q* являлись доминирующими, однако ни одна из них не была связана с фенотипической устойчивостью *H. pylori* к MTZ. Мутаций, приводящих к сдвигу рамки считывания или замене аминокислоты на стоп-кодон, в гене *fur* у изолятов нашей выборки не обнаружено.

Обсуждение

Неуклонный рост АБР *H. pylori* во всём мире существенно влияет на эффективность схем эрадикационной терапии. По результатам метаанализа в России за 2011–2020 гг., наиболее значительный рост устойчивости *H. pylori* отмечен к MTZ (33,95%) и LVX (20,0%) [15]. Однако анализ исследований за 2015–2019 и 2020–2024 гг. выявил снижение LVX-R с 18,3 до 17,1% [15, 16]. Вместе с тем необходимо признать, что данные по уровням и распространённости АБР отсутствуют для большинства регионов России [2].

Наше исследование, включающее 43 клинических изолята *H. pylori,* выделенных за 2014–2022 гг. на территории Санкт-Петербурга, показало высокий уровень MTZ-R — 74,4%, что указывает на необходимость проведения полномасштабного исследования резистентности *H. pylori* в данном регионе и ставит под сомнение эффективность применения MTZ в схеме эрадикационной терапии. Напротив, к LVX — препарату 2-й и 3-й линий — штаммы нашей выборки показали более низкую устойчивость — 27,9%. Однако стоит отметить, что среди LVX-R-изолятов лишь 15,0% являлись монорезистентными.

Суммируя представленные нами ранее данные по устойчивости данной выборки к кларитромицину, 20,9% изолятов *H. pylori* являются полирезистентными и проявляют устойчивость одновременно к 3 АБП: LVX, MTZ и кларитромицину [17]. Полирезистентные штаммы *H. pylori* являются глобальной проблемой современной гастроэнтерологии и основным препятствием для эффективного проведения эрадикационной терапии. При наличии резистентности *H. pylori* к одному из основных АБП частота неудач стандартных схем эрадикации может достигать 30%, а при двойной резистентности — превышать 70% [18, 19]. Поскольку выбор схемы эрадикации носит эмпирический характер, полученные данные диктуют необходимость глобального регионального и локального мониторинга АБР *H. pylori* в нашей стране, а также адаптации соответствующих стратегий лечения в каждом регионе в зависимости от полученных данных и внедрения программы рационального использования АБП в схемах эрадикационной терапии [20].

В связи с тем, что полногеномное секвенирование является наиболее точным, надёжным, быстрым и эффективным методом определения известных и поиска новых паттернов резистентности, мы использовали данный метод для выявления детерминант резистентности к LVX и MTZ, а также их ассоциации с фенотипической лекарственной устойчивостью российской популяции *H. pylori*.

Анализ полученных данных показал, что из всех мутаций в генах *gyrA* и *gyrB* только *D91Y/N/G* в гене *gyrA* значимо ассоциирована с фенотипической устойчивостью *H. pylori* к LVX ($p < 0,05$). Другая мутация, связанная с развитием резистентности к фторхинолонам, — *N87K* — в нашем исследовании выявлена лишь в 16,7% случаев ($p > 0,05$). Тем не менее, учитывая низкую частоту обнаружения мутации *D91Y/N/G*, а также отсутствие мутаций *D91* и *N87* у LVX-S-изолятов, целесообразно рассматривать комбинированную детекцию мутаций *D91Y/N/G* и *N87K* в качестве более надёжных предикторов устойчивости *H. pylori* к LVX. С другой стороны, принимая во внимание высокую долю LVX-R-штаммов, не несущих маркеров резистентности в своём геноме (50,0%), генотипирование гена *gyrA* для детекции фенотипической устойчивости к LVX может быть недостаточным, что, в свою

очередь, ставит под сомнение рациональность использования генотипа *D91+N87 gyrA* в качестве единственных мишеней при разработке ПЦР-тестов для определения АБР *H. pylori* в клинической практике. Следует отметить, что мутации *D91* и *N87* присутствовали геноме только полирезистентных изолятов, тогда как среди монорезистентных к LVZ изолятов данные мутации не выявлены. Это может свидетельствовать как о существовании других, не изученных механизмов резистентности, так и об участии фенотипических механизмов резистентности, таких как изменение уровня экспрессии систем эффлюкса, формирования биоплёнок и др. Кроме того, полирезистентные штаммы могут возникать под давлением комбинированной антибиотикотерапии, что стимулирует накопление мутаций, в том числе в гене *gyrA,* связанного с устойчивостью к фторхинолонам. Полученные данные нуждаются в дальнейшем изучении с использованием расширенной выборки устойчивых и чувствительных к LVX изолятов *H. pylori.*

Ввиду высокой гетерогенности штаммов *H. pylori* изучение и выявление механизмов устойчивости *H. pylori* к MTZ остаётся сложной задачей. Принято считать, что устойчивость *H. pylori* к MTZ обусловлена главным образом инактивацией генов *rdxA* и *frxA*, кодирующих восстановленную форму никотинамидадениндинуклеотидфосфат (NAD(P)H) нитроредуктазы и флавиннитроредуктазы, катализирующих снижение количества MTZ в клетке [21]. В многочисленных зарубежных исследованиях показано, что большинство MTZ-R-штаммов *H. pylori* являются носителями множественных нонсенс- и/или fs-мутаций, приводящих к потере функциональных сайтов связывания нитроредуктаз.

В нашем исследовании мутации в гене *rdxA*, приводящие к потере стоп-кодона, преждевременной терминации или сдвигу рамки считывания, были обнаружены у 21,9% MTZ-R-изолятов и отсутствовали в группе MTZ-S-изолятов. Это может указывать на роль данного гена в развитии АБР у российской популяции *H. pylori*. Согласно данным E.G. Chua и соавт., мутация *R16H/C* в гене *rdxA* ассоциирована с фенотипической устойчивостью изолятов *H. pylori* к MTZ [22]. Результаты настоящего исследования показали, что мутация *R16C*, а также мутации *S108A/P* и *L62V* в гене *rdxA* встречались только у изолятов, устойчивых к MTZ, с частотой 21,9, 21,9 и 18,7% соответственно. Однако, учитывая неравномерное распределение долей MTZ-R и MTZ-S изолятов в нашей выборке (74,4 и 25,6%), влияние данных мутаций на развитие фенотипической устойчивости к MTZ ещё предстоит выяснить.

Аналогично, множественные мутации, приводящие к потере функциональности генов *frxA* и *fdxB*, могут являться предикторами фенотипической устойчивости *H. pylori* к MTZ. В нашем исследовании fs-мутации в указанных генах, приводящие к сдвигу рамки считывания, распределялись между изолятами как устойчивой, так и чувствительной фенотипических групп. В гене *fur* мутаций, ассоциированных с фенотипической устойчивостью к MTZ, не выявлено. Полученные результаты косвенно свидетельствуют о том, что указанные гены, по всей видимости, не играют ключевой роли в развитии устойчивости *H. pylori* к MTZ в исследуемой популяции. Тем не менее для более точного понимания механизмов резистентности необходимо дополнительное исследование, включающее комплексный анализ других потенциальных генетических факторов в совокупности с возможными синергетическими или эпистатическими взаимодействиями.

Ограничения исследования. Размер выборки ограничен как численно, так и территориально, что не позволяет выявить закономерности генотипической и фенотипической устойчивости изолятов *H. pylori* на всей территории России. Наблюдалось неравномерное распределение устойчивых и чувствительных к MTZ и LVX изолятов, что существенно осложняет интерпретацию полученных данных и снижает статистическую надёжность результатов. Однако, несмотря на указанные ограничения, наши данные предоставили важную информацию о паттернах резистентности российских клинических изолятов *H. pylori*, а также подчеркнули необходимость глобального мониторинга АБР в нашей стране.

Заключение

На основании данных полногеномного секвенирования, выполненного нами впервые, было проведено комплексное исследование фенотипической и генотипической резистентности российских клинических изолятов *H. pylori* к LVX и MTZ. Результаты исследования продемонстрировали высокую долю изолятов, устойчивых к MTZ и LVX, а также высокую частоту полирезистентных изолятов, устойчивых одновременно к 3 АБП (LVX + MTZ + кларитромицин). Несмотря на ограниченный размер выборки, нам удалось подтвердить ключевую роль мутаций *D91* и *N87* в гене *gyrA* в формировании устойчивости *H. pylori* к LVX. Однако высокая частота устойчивых изолятов, не несущих известных детерминант резистентности, ставит под сомнение эффективность существующих и разрабатываемых тест-систем для определения чувствительности *H. pylori*, а также диктует необходимость проведения более масштабных исследований механизмов АБР изолятов *H. pylori*.

Полученные результаты подчёркивают исключительную важность вопросов, связанных с непрерывным мониторингом АБР *H. pylori* в нашей стране, а также контролем динамики изменения ге-

нома и механизмов формирования АБР. Это, в свою очередь, может стать предпосылкой к оптимизации схем эрадикационной терапии и повышению эффективности лечения инфекций, обусловленных *H. pylori*, в разных регионах России.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Moss S.F., Shah S.C., Tan M.C., El-Serag H.B. Evolving concepts in *Helicobacter pylori* management. *Gastroenterology*. 2024;166(2):267–83.
DOI: https://doi.org/10.1053/j.gastro.2023.09.047.
2. Ивашкин В.Т., Маев И.В., Лапина Т.Л. и др. Клинические рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации по диагностике и лечению инфекции *Helicobacter pylori* у взрослых. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2018;28(1):55–70. Ivashkin V.T., Maev I.V., Lapina T.L., et al. Diagnostics and treatment of *Helicobacter pylori* infection in adults: Clinical guidelines of the Russian gastroenterological association. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*. 2018;28(1):55–70.
DOI: https://doi.org/10.22416/1382-4376-2018-28-1-55-70
EDN: https://elibrary.ru/oulikb
3. Malfertheiner P., Megraud F., Rokkas T., et al. European Helicobacter and Microbiota Study group. Management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht VI/Florence consensus report. *Gut*. 2022;71(9):327745.
DOI: https://doi.org/10.1136/gutjnl-2022-327745
4. Savoldi A., Carrara E., Graham D.Y., et al. Prevalence of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: a systematic review and meta-analysis in World Health Organization regions. *Gastroenterology*. 2018;155(5):1372–82.e17.
DOI: https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.07.007
5. Zhao M., Zhang Y., Liu S., et al. Eradication of *Helicobacter pylori* reshapes gut microbiota and facilitates the evolution of antimicrobial resistance through gene transfer and genomic mutations in the gut. *BMC Microbiol*. 2025;25(1):90.
DOI: https://doi.org/10.1186/s12866-025-03823-w
6. Hasanuzzaman M., Bang C.S., Gong E.J. Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori*: mechanisms and clinical implications. *J. Korean Med. Sci*. 2024;39(4):e44.
DOI: https://doi.org/10.3346/jkms.2024.39.e44
7. Schuetz A.N., Theel E.S., Cole N.C., et al. Testing for *Helicobacter pylori* in an era of antimicrobial resistance. *J. Clin. Microbiol*. 2024;62(2):e0073223.
DOI: https://doi.org/10.1128/jcm.00732-23
8. Dascălu R.I., Bolocan A., Păduaru D.N., et al. Multidrug resistance in *Helicobacter pylori* infection. *Front. Microbiol*. 2023;14:1128497.
DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1128497
9. Medakina I., Tsapkova L., Polyakova V., et al. *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: molecular basis and diagnostic methods. *Int. J. Mol. Sci*. 2023;24(11):9433.
DOI: https://doi.org/10.3390/ijms24119433
10. Saracino I.M., Pavoni M., Zullo A., et al. Next generation sequencing for the prediction of the antibiotic resistance in *Helicobacter pylori:* a literature review. *Antibiotics* (*Basel*). 2021;10(4):437.
DOI: https://doi.org/10.3390/antibiotics10040437
11. Zhong Z., Zhang Z., Wang J., et al. A retrospective study of the antibiotic-resistant phenotypes and genotypes of *Helicobacter pylori* strains in China. *Am. J. Cancer Res*. 2021;11(10):5027–37.
12. Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 2013;29(8):1072–5.
DOI: https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086
13. Prjibelski A., Antipov D., Meleshko D., et al. Using SPAdes *de novo* assembler. *Curr. Protoc. Bioinformatics*. 2020;70(1):e102.
DOI: https://doi.org/10.1002/cpbi.102
14. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012;28(8):1166–7.
DOI: https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091
15. Андреев Д.Н., Маев И.В., Кучерявый Ю.А. Резистентность *Helicobacter pylori* в Российской Федерации: метаанализ исследований за последние 10 лет. *Терапевтический архив*. 2020;92(11):24–30. Andreev D.N., Maev I.V., Kucheryavyy Yu.A. *Helicobacter pylori* resistance in the Russian Federation: a meta-analysis of studies over the past 10 years. *Therapeutic Archive*. 2020;92(11):24–30.
DOI: https://doi.org/10.26442/00403660.2020.11.000795
EDN: https://elibrary.ru/gsmibf
16. Andreev D.N., Khurmatullina A.R., Maev I.V., et al. *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in Russia: a systematic review and meta-analysis. *Antibiotics (Basel)*. 2025;14(5):524.
DOI: https://doi.org/10.3390/antibiotics14050524
17. Starkova D., Gladyshev N., Polev D., et al. First insight into the whole genome sequence variations in clarithromycin resistant *Helicobacter pylori* clinical isolates in Russia. *Sci. Rep*. 2024;14(1):20108.
DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-024-70977-4
18. Zou Y., Qian X., Liu X., et al. The effect of antibiotic resistance on *Helicobacter pylori* eradication efficacy: a systematic review and meta-analysis. *Helicobacter*. 2020;25(4):e12714.
DOI: https://doi.org/10.1111/hel.12714
19. Gatta L., Scarpignato C., Fiorini G., et al. Impact of primary antibiotic resistance on the effectiveness of sequential therapy for *Helicobacter pylori* infection: lessons from a 5-year study on a large number of strains. *Aliment. Pharmacol. Ther*. 2018;47(9):1261–9. DOI: https://doi.org/10.1111/apt.14597
20. Полякова В.В., Бодунова Н.А., Цапкова А., Бордин Д.С. Резистентность *Helicobacter pylori* к антибиотикам и возможности оптимизации эрадикационной терапии. *Эффективная фармакотерапия*. 2024;20(46):36–44. Polyakova V.V., Bodunova N.A., Tsapkova L.A., Bordin D.S. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics and possibilities for optimization of eradication therapy. *Effective Pharmacotherapy.* 2024;20(46):36–44.
DOI: https://doi.org/10.33978/2307-3586-2024-20-46-36-44
EDN: https://elibrary.ru/motwfv
21. Tuan V.P., Narith D., Tshibangu-Kabamba E., et al. A next-generation sequencing-based approach to identify genetic determinants of antibiotic resistance in Cambodian *Helicobacter pylori* clinical isolates. *J. Clin. Med*. 2019;8(6):858.
DOI: https://doi.org/10.3390/jcm8060858
22. Chua E.G., Debowski A.W., Webberley K.M., et al. Analysis of core protein clusters identifies candidate variable sites conferring metronidazole resistance in *Helicobacter pylori. Gastroenterol. Rep. (Oxf.)*. 2019;7(1):42–9.
DOI: https://doi.org/10.1093/gastro/goy048

Информация об авторах

Старкова Дарья Андреевна✉ — канд. биол. наук, с. н. с. лаб. идентификации патогенов, с. н. с. лаб. молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, dariastarkova13@gmail.com, https://orcid.org/0000-0003-3199-8689

Гладышев Никита Сергеевич — н. с. лаб. морфологии и патологии опорно-двигательного аппарата НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. Б.В. Петровского, Москва, Россия, krinege@mail.ru, https://orcid.org/0000-0003-2732-5676

Полев Дмитрий Евгеньевич — канд. биол. наук, с. н. с., зав. лаб. метагеномных исследований НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, polev@pasteurorg.ru, https://orcid.org/0000-0001-9679-2791

Саитова Алина Тимуровна — м. н. с. лаб. метагеномных исследований НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, saitova@pasteurorg.ru, https://orcid.org/0000-0002-5921-0745

Глазунова Ксения Александровна — студентка Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Россия, glazunovak03@mail.ru, https://orcid.org/0009-0009-8001-2143

Егорова Светлана Александровна — д-р мед. наук, зав. лаб. идентификации патогенов НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, egorova@pasteurorg.ru, https://orcid.org/0000-0002-7589-0234

Сварваль Алена Владимировна — канд. мед. наук, с. н. с. лаб. идентификации патогенов НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия, svarval@pasteurorg.ru, https://orcid.org/0000-0001-9340-4132

Участие авторов: *Старкова Д.А.* — биоинформатический анализ, анализ данных, дизайн исследования, написание рукописи; *Гладышев Н.С.* — биоинформатический анализ и статистический анализ; *Полев Д.Е., Саитова А.Т.* — секвенирование, биоинформатический анализ; *Глазунова К.А.* — анализ данных, визуализация данных; *Егорова С.А.* — администрирование проекта, руководство работой; *Сварваль А.В.* — подготовка материала, культуральные методы, курирование 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 10.06.2025;
принята к публикации 15.08.2025;
опубликована 28.08.2025

Information about the authors

Daria A. Starkova✉ — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of pathogen identification, senior researcher, Laboratory of molecular epidemiology and evolutionary genetics, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, dariastarkova13@gmail.com, https://orcid.org/0000-0003-3199-8689

Nikita S. Gladyshev — researcher, Laboratory of morphology and pathology of the musculoskeletal system, Avtsyn Research Institute of Human Morphology, Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russia, krinege@mail.ru, https://orcid.org/0000-0003-2732-5676

Dmitrii E. Polev — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Head, Laboratory of metagenomics research, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, polev@pasteurorg.ru, https://orcid.org/0000-0001-9679-2791

*Alina T. Saitov*a — junior researcher, Laboratory of metagenomics research, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, saitova@pasteurorg.ru, https://orcid.org/0000-0002-5921-0745

Ksenia A. Glazunova — student, Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia, glazunovak03@mail.ru, https://orcid.org/0009-0009-8001-2143

Svetlana A. Egorova — Dr. Sci. (Med.), Head, Laboratory of pathogen identification, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, egorova@pasteurorg.ru, https://orcid.org/0000-0002-7589-0234

Alena V. Svarval — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of pathogen identification, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, svarval@pasteurorg.ru, https://orcid.org/0000-0001-9340-4132

Authors' contribution: D.

Starkova D.A. — bioinformatics, study design and writing the manuscript; *Gladyshev N.S.* — bioinformatics and statistical analysis; *Polev D.E., Saitova A.T.* — sequencing, bioinformatics; *Glazunova K.A.* — data analysis, data vizualization; *Egorova S.A.* —supervision, project administration; *Svarval A.V.* — material preparation, culture methods, data curation. 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 10.06.2025;
accepted for publication 15.08.2025;
published 28.08.2025

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-690
ORIGINAL RESEARCHES

Оригинальное исследование
https://doi.org/10.36233/0372-9311-690

Стабилизация растворов тигециклина при тестировании чувствительности микроорганизмов методом микроразведений в бульоне

Косилова И.С.✉, Домотенко Л.В., Храмов М.В.

Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Московская область, Россия

Аннотация

Введение. Тигециклин широко используется при лечении инфекций, что приводит к появлению устойчивых к нему бактерий. Определение чувствительности методом микроразведений в бульоне рекомендовано проводить, используя свежеприготовленный бульон Мюллера–Хинтон (МХБ) или МХБ с антиоксидантными добавками, что обусловлено окислением антибиотика. Вместе с тем отсутствует информация о возможности хранения и дальнейшего использования растворов антибиотика.

Цель исследования **—** определить возможность стабилизации и рационального использования растворов тигециклина для получения допустимых значений минимальных подавляющих концентраций (МПК) при тестировании контрольных штаммов референтным методом.

Материалы и методы. В работе определяли МПК тигециклина для *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 методом микроразведений в МХБ, заранее приготовленном и хранившемся 24–48 ч до исследования. Для исследования готовили базовый раствор тигециклина в воде и с добавлением различных концентраций оксиразы, которые хранили при 2–6°C и –70°C и затем проводили тестирование в соответствии с ГОСТ Р ИСО 20776-1-2022.

Результаты. В ходе исследования установлено, что при 2–6°C стабильность базовых растворов тигециклина сохраняется не более 5 ч, а с добавлением 5,0–8,0% оксиразы увеличивается до 16 сут, что позволяет получать значения МПК для всех тест-штаммов в допустимом диапазоне. Изменение температуры хранения до –70°C увеличивает стабильность растворов до 43 сут, а с добавлением 5,0–8,0% оксиразы — минимум до 48 нед.

Заключение. Определена возможность стабилизации растворов тигециклина, хранившихся при отрицательных температурах (с добавлением оксиразы и без неё) для получения допустимых значений МПК при определении чувствительности контрольных штаммов к антимикробным препаратам. Применение данных растворов позволило снизить затраты на тестирование за счёт рационального использования антибиотика.

Ключевые слова: *тигециклин, определение чувствительности, метод микроразведений в бульоне, оксираза, бульон Мюллера–Хинтон.*

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: Косилова И.С., Домотенко Л.В., Храмов М.В. Стабилизация растворов тигециклина при тестировании чувствительности микроорганизмов методом микроразведений в бульоне. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2025;102(4):474–481.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-690
EDN: https://www.elibrary.ru/YNTISP

Original Study Article
https://doi.org/10.36233/0372-9311-690

Stabilization of tigecycline solutions during susceptibility testing of microorganisms by broth microdilution method

Irina S. Kosilova✉, Lyubov V. Domotenko, Mikhail V. Khramov

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russia

© Косилова И.С., Домотенко Л.В., Храмов М.В., 2025

Abstract

Introduction. Tigecycline is widely used in the treatment of infections, leading to the emergence of resistant bacteria. Determining susceptibility by broth microdilution method is recommended to be conducted using freshly prepared Mueller–Hinton broth (MHB) or MHB with antioxidant additives, due to the oxidation of the antibiotic. At the same time, there is no information on the possibility of storing and further using antibiotic solutions.

The aim of the study is to determine the feasibility of stabilizing and rationally using tigecycline solutions to achieve acceptable values of minimum inhibitory concentrations (MIC) when testing control strains by the reference method.

Materials and methods. In the study, the MIC of tigecycline for *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, and *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 was determined using the microdilution method in MHB, which was pre-prepared and stored for 24–48 hours prior to the study. For the study, a tigecycline stock solution was prepared in water with the addition of various concentrations of Oxyrase, which were stored at 2–6°C and –70°C, and then testing was conducted in accordance with GOST R ISO 20776-1-2022.

Results. The stability of the tigecycline stock solutions does not exceed 5 hours at 2–6°C, but with the addition of 5.0–8.0% Oxyrase, it increases to 16 days, allowing for the determination of MIC values for all test strains within the acceptable range. Changing the storage temperature to –70°C increases the stability of the solutions to 43 days, and with the addition of 5.0–8.0% Oxyrase, to at least 48 weeks

Conclusion. The possibility of stabilizing tigecycline solutions stored at negative temperatures (with and without the addition of Oxyrase) has been determined to obtain acceptable MIC values when determining the susceptibility of control strains to antimicrobial agents. The use of these solutions allowed for a reduction in testing costs through the rational use of the antibiotic.

Keywords: *tigecycline, susceptibility testing, broth microdilution method, Oxyrase, Mueller–Hinton broth*

Funding source. The study was carried out within the Rospotrebnadzor industry program.

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

For citation: Kosilova I.S., Domotenko L.V., Khramov M.V. Stabilization of tigecycline solutions during susceptibility testing of microorganisms by broth microdilution method. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2025;102(4):474–481.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-690
EDN: https://www.elibrary.ru/YNTISP

Введение

Микроорганизмы, устойчивые к антимикробным препаратам, являются одной из самых больших угроз для здравоохранения и продовольственной безопасности во всём мире [1]. Стремительный рост распространения грамотрицательных микроорганизмов, особенно относящихся к *Enterobacterales* и *Acinetobacter* spp., которые проявляют устойчивость к препаратам выбора карбапенемам, ставит под угрозу эффективность их применения. Для лечения инфекций, вызванных такими штаммами микроорганизмов, используют в основном колистин и тигециклин [2, 3]. Однако в настоящее время более чем в 40 странах, включая Россию, зафиксировано глобальное распространение резистентности у исследуемых штаммов к колистину, опосредованное геном *mcr* (mobilized colistin resistance), что значительно снижает его клиническую эффективность [4–7], поэтому тигециклин является критически важным для медицины препаратом[1], особенно при лечении инфекций, вызванных микроорганизмами с множественной лекарственной устойчивостью [8].

Тигециклин — антибиотик нового класса глицилциклинов, обладает широким спектром действия, структурно сходен с тетрациклинами, но более активен в отношении большинства грамположительных и грамотрицательных штаммов микроорганизмов. Однако некоторые бактерии, такие как *Morganella* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp. и *Pseudomonas aeruginosa*, проявляют природную устойчивость к тигециклину [9], описана пониженная чувствительность *A. baumannii* к нему [10], а у *Klebsiella pneumoniae, E. aerogenes*, *E. cloacae* и др. может развиться приобретённая устойчивость к тигециклину, обусловленная сверхэкспрессией гена неспецифичного активного выведения *ArcAB*, который обеспечивает резистентность ко многим лекарственным препаратам [11].

Для выбора и коррекции антибактериальной терапии рекомендуется проводить микробиологическую диагностику с идентификацией возбудителя и определением его чувствительности к тигециклину.

Референтным методом определения чувствительности является метод микроразведений в бульоне Мюллера–Хинтон (МХБ), позволяющий определять значения минимальных подавляющих концентраций (МПК) тестируемых антибиотиков. В ходе установления допустимых значений

[1] WHO. Critically important antimicrobials for human medicine (6th revision ed.) URL: https://www.who.int/publications/i/item/9789241515528 (дата обращения: 03.03.2025).

© Kosilova I.S., Domotenko L.V., Khramov M.V., 2025

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-690

МПК тигециклина для контрольных штаммов были выявлены несоответствия в значениях МПК, которые были связаны со сроком хранения МХБ. Результаты ряда исследований показали, что при тестировании в свежеприготовленном (менее чем за 12 ч до начала тестирования) МХБ тигециклин был в 2–3 раза более активен в отношении 3 контрольных штаммов (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 и *Enterococcus faecalis* ATCC 29212), чем в хранившейся среде (МПК 0,03–0,25 и 0,12–0,50 мкг/мл соответственно) [12–14]. В связи с этим международными стандартами CLSI[2], EUCAST[3] и российскими рекомендациями[4] для определения значений МПК тигециклина с помощью метода микроразведений в бульоне рекомендовано использовать только свежеприготовленный МХБ.

Нестабильность тигециклина в водных растворах связана с его химическим строением, т. к. он может быть подвержен двум химических процессам, приводящим к образованию фармакологически неактивных продуктов. С одной стороны, фенольная группа тигециклина делает его чувствительным к окислению, особенно при значениях pH, превышающих значение 7,0, с другой стороны, при более низком значении pH тигециклин более подвержен неферментативной эпимеризации[5].

Для терапевтических целей тигециклин выпускается в виде лиофилизированного порошка[6], содержащего вспомогательные вещества в виде лактозы для стабилизации препарата против эпимеризации, и соляную кислоту или гидроксида натрия для регулирования pH в диапазоне 4,5–5,5 и для предотвращения окисления [10, 15].

Поскольку pH МХБ со временем не изменяется, причину расхождений в результатах МПК связывают с ускорением окислительного разложения тигециклина, вызванного увеличением количества растворённого кислорода в МХБ во время хранения. Для стабилизации тигециклина исследованы различные антиоксидантные добавки в МХБ: аскорбиновая кислота, пируват натрия, тиогликолят натрия, L-цистеин, каталаза, а также анаэробные условия хранения МХБ [12, 15, 16]. Добавление аскорбиновой кислоты и пирувата в концентрациях 0,3 и 6% соответственно способствовало стабилизации тигециклина до 7 дней. Однако в исследовании [16] показано, что аскорбиновая кислота вызывает быструю деградацию тигециклина и приводит к потере антибактериальной активности. В ряде публикаций исследована возможность использования оксиразы — фермента, способствующего снижению концентрации кислорода в МХБ [12, 14, 16]. Результаты исследований показали сохранение активности тигециклина в 2% растворе оксиразы вплоть до 7 сут при 4–6°C.

В исследовании [12] описано применение замораживания при –20°C МХБ, содержащего тигециклин и разлитого в 96-луночные планшеты. Тестирование чувствительности тест-штаммов после размораживания показало, что активность антибиотика сохранялась до 6 нед, и результаты тестирования совпадали с данными, полученными со свежеприготовленным МХБ.

Анализ публикаций показал, что в исследованиях все манипуляции (антиоксидантные добавки, хранение в замороженном состоянии, в анаэробных условиях) проводили с МХБ, поэтому представляется важным изучение возможности хранения именно водных растворов антибиотика.

В соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 20776-1-2022[7], который регламентирует процедуру выполнения метода микроразведений в бульоне, для тестирования используют базовые (основные) растворы антибиотиков, часть объёма которых, как правило, остаётся недоиспользованной. Требованиями ГОСТ Р ИСО 20776-1-2022 разрешено хранение стабильных растворов антибиотиков, а хранение нестабильных, к которым относятся водные растворы тигециклина, никак не регламентируется. Только уточняется, что если нет информации о стабильности растворов при определённых условиях хранения, то свежий базовый (основной) раствор следует готовить для каждой исследуемой партии.

Цель исследования — определить возможность стабилизации и рационального использования растворов тигециклина для получения допусти-

[2] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Thirty-third Informational Supplement. CLSI document M100, 33rd Edition. USA; 2022. 402 p.

[3] European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters (Version 15.0). URL.: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_15.0_Breakpoint_Tables.pdf (дата обращения: 12.03.2025).

[4] Российские рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (версия 2024-02). URL: https://www.antibiotic.ru/files/334/ocmap2024.pdf

[5] Fawzi M.B., Zhu T., Shah S.M. Tigecycline compositions and methods of preparation (patent). United States US-8975242-B2. 2011. URL.: https://patentimages.storage.googleapis.com/c2/25/07/73a12f6c15cdfa/US8975242.pdf (дата обращения: 07.03.2025).

[6] Справочник лекарственных средств. Тигацил. Инструкция по применению. 2024. URL: https://www.vidal.ru/drugs/tigacil__23094 (дата обращения 12.03.2025).

[7] ГОСТ Р ИСО 20776-1-2022 Исследование чувствительности инфекционных агентов и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам. Часть 1. Референтный метод микроразведений в бульоне для лабораторного исследования активности антимикробных агентов по отношению к быстрорастущим аэробным бактериям, вызывающим инфекционные заболевания. 2022, 20 с.

мых значений МПК при тестировании контрольных штаммов референтным методом.

Материалы и методы

В работе использовали химические субстанции тигециклина («Sigma») и оксиразы («Sigma»). Определение значений МПК тигециклина для контрольных (тест-штаммов) *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 проводили методом микроразведений в МХБ (ГНЦ ПМБ), который заранее готовили и хранили 24–48 ч до исследования при комнатной температуре. При работе с тест-штаммом *S. pneumoniae* ATCC 49619 в бульон добавляли 5% лизированной лошадиной крови и 20 мг/л β-NAD («Sigma»). Все использованные в работе штаммы получены в лиофилизированном виде из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ГКПМ-Оболенск.

Лизированную лошадиную кровь готовили из дефибринированной («ЭКОлаб»). Для этого в дефибринированную лошадиную кровь добавляли стерильную деионизированную воду в соотношении 1 : 1, помещали в морозильную камеру на 7–8 ч при –20°C. Затем размороженную при комнатной температуре кровь повторно подвергали замораживанию–оттаиванию, повторяя данный цикл 4 раза до полного лизиса кровяных клеток. После этого лизированную лошадиную кровь осветляли центрифугированием при 7000 об/с в течение 30 мин на центрифуге «Eppendorf Centrifuge 5702» («Eppendorf»).

Тестирование проводили в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 20776-1-2022 в 3 повторностях. Для этого готовили базовый (основной) раствор тигециклина с концентрацией 512 мг/л в воде и в воде с добавлением различных концентраций оксиразы (2,0, 3,0, 5,0 и 8,0%), хранили при 2–6°C в бытовом холодильнике и при –70°C в низкотемпературном кельвинаторе «MDF-U33V» («Sanyo»). Через каждый час отдельные аликвоты раствора вынимали из камеры хранения, размораживали при комнатной температуре в течение 20–30 мин, готовили рабочие (двукратные) разведения в дистиллированной воде в диапазоне концентраций 0,016–1,000 мг/л и заполняли ими 96-луночный планшет.

Инокуляты всех тест-штаммов готовили в физиологическом растворе с концентрацией $1–2 \times 10^8$ КОЕ/мл и по 0,1 мл добавляли в 9,9 мл МХБ с двойной концентрацией. Инокуляты в МХБ вносили в соотношении 1 : 1 в подготовленные планшеты, которые инкубировали при 35 ± 1°C в течение 18 ± 2 ч, планшеты с *S. pneumoniae* ATCC 49619 — в атмосфере 4–6% CO_2. Учёт результатов проводили по методологии EUCAST.

Результаты обрабатывали при помощи пакета программ «MS Excel». Достоверность различных средних величин оценивали с использованием t-критерия Стьюдента. Для сравнительного анализа использовали двусторонний критерий Фишера. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

МПК тигециклина для всех тест-штаммов при использовании базовых растворов, хранившихся при 2–6°C до 3 ч, соответствовали целевым значениям, а при дальнейшем хранении до 5 ч — входили в допустимый интервал (**табл. 1**). Далее с увеличением времени хранения значения МПК превышали допустимый интервал.

Величина МПК тигециклина для всех тест-штаммов при использовании базовых растворов антибиотика, хранившихся при –70°C до 31 сут, соответствовала целевым значениям, при дальнейшем хранении до 43 сут — входила в допустимые интервалы (**табл. 2**). Более длительное хранение (≥ 44 сут) приводило к получению значений МПК для всех 4 тест-штаммов, превышающих допустимые диапазоны.

Таблица 1. Влияние времени хранения при 2–6°C базового раствора тигециклина на величину МПК, мг/л

Время хранения базового (основного) раствора тигециклина	*E. coli* ATCC 25922	*S. aureus* ATCC 29213	*E. faecalis* ATCC 29212	*S. pneumoniae* ATCC 49619
0 ч (контроль)	0,06–0,12	0,06–0,12	0,03–0,06	0,03–0,06
1–2 ч	0,06–0,12	0,06–0,12	0,03–0,06	0,03–0,06
3 ч	0,06–0,12	0,06–0,12	0,03–0,06	0,03–0,06
4 ч	0,12–0,25	0,12–0,25	0,03–0,12	0,06–0,12
5 ч	0,12–0,25	0,12–0,25	0,06–0,12	0,06–0,12
6 ч	0,5–1,0	0,5–1,0	0,5–1,0	0,5–1,0
7 ч	0,5–1,0	0,5–1,0	0,5–1,0	0,5–1,0
8–10 ч	≥ 1,0	≥ 1,0	≥ 1,0	≥ 1,0
Допустимый интервал, мг/л	0,03–0,25	0,03–0,25	0,03–0,12	0,016–0,12
Целевые значения, мг/л	0,06–0,12	0,06–0,12	0,06	0,03–0,06

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-690

Таблица 2. Влияние времени хранения при –70°С базовых растворов тигециклина на значение МПК, мг/л

Время хранения растворов тигециклина, сут	*E. coli* ATCC 25922	*S. aureus* ATCC 29213	*E. faecalis* ATCC 29212	*S. pneumoniae* ATCC 49619
1–18	0,06–0,12	0,06–0,12	0,03–0,06	0,03–0,06
19–31	0,06–0,12	0,06–0,12	0,03–0,06	0,03–0,06
32–43	0,12–0,25	0,12–0,25	0,06–0,12	0,06–0,12
44–56	0,5–1,0	0,5–1,0	0,25–0,50	0,25–0,50
57–68	0,5–1,0	0,5–1,0	0,25–0,50	0,25–0,50
69–80	0,5–1,0	0,5–1,0	0,5–1,0	0,5–1,0
≥ 81	≥ 1,0	≥ 1,0	≥ 1,0	≥ 1,0
Допустимый интервал, мг/л	0,03–0,25	0,03–0,25	0,03–0,12	0,016–0,120
Целевые значения, мг/л	0,06–0,12	0,06–0,12	0,06	0,03–0,06

Результаты, полученные на первом этапе исследования, показали, что активность базовых растворов тигециклина сохранялась более длительное время при –70°С (до 43 сут), чем при 2–6°С (не более 5 ч), что обеспечивало получение МПК тигециклина для всех тест-штаммов в допустимых интервалах значений.

Второй этап исследования посвящен изучению влияния добавки оксиразы на величину МПК тигециклина для 4 тест-штаммов. Увеличение концентрации оксиразы способствовало более длительному хранению базовых растворов тигециклина при –2–6°С по сравнению с растворами без стабилизатора, т. к. полученные значения МПК для исследованных тест-штаммов соответствовали допустимым значениям более длительное время (**рисунок**, **табл. 3**). Добавление оксиразы в концентрациях 5 и 8% к базовому раствору тигециклина увеличивало время его хранения при 2–6°С с 4–5 ч до 16 сут и обеспечивало получение допустимых значений МПК для 4 тест-штаммов.

Результаты измерений МПК тигециклина для тест-штаммов, полученные с помощью стабилизированных оксиразой базовых растворов антибиотика в процессе хранения при –70°С, приведены в **табл. 4**. Для удобства результаты МПК представлены в условных единицах: средние значения МПК из 3 измерений, входящие в допустимый интервал, обозначали «С» (Correct); средние значения из 3 измерений, превышающие допустимый интервал, обозначали «НЕ» (High error).

Как видно из табл. 4, использование оксиразы в качестве стабилизатора базовых растворов тигециклина показало, что стабильность данных растворов сохраняется до 18 нед при добавлении 2% оксиразы, до 28 нед при добавлении 3% оксиразы, до 48 нед при добавлении 5 или 8% оксиразы и приводит к получению значений МПК тигециклина для всех исследованных тест-штаммов, соответствующих допустимым величинам (С).

Обсуждение

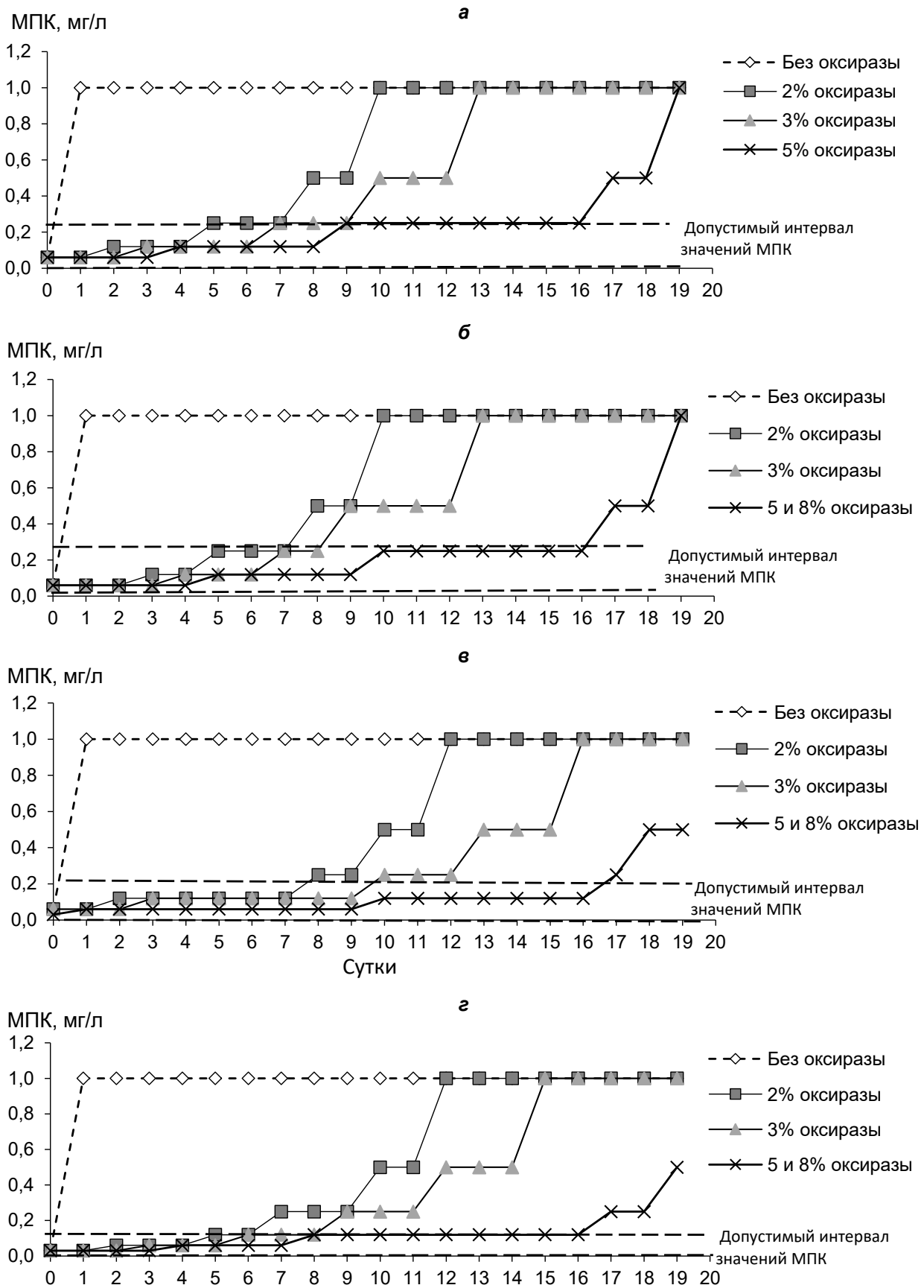
В настоящее время тигециклин является препаратом выбора при лечении многих тяжёлых инфекций, вызванных микроорганизмами с множественной лекарственной устойчивостью. Из-за своей антибактериальной активности широкого спектра действия тигециклин часто применяют эмпирически, что приводит к появлению устойчивых к нему бактерий [17].

Поэтому лечение инфекционных болезней, в том числе тигециклином, целесообразно проводить на основе результатов идентификации возбудителя и определения чувствительности к антимикробным препаратам.

Определение чувствительности к тигециклину методом микроразведений в бульоне сопряжено с проблемой, связанной с его нестабильностью в водных растворах. Для получения достоверных результатов тестирования стандартами CLSI и EUCAST предложено использовать свежеприготовленный МХБ.

В данном исследовании изучено влияние различных способов стабилизации базовых водных растворов тигециклина: с помощью изменения температуры хранения и использования стабилизатора оксиразы в различных концентрациях для 4 тест-штаммов, включая тест-штамм со сложными питательными потребностями — *S. pneumoniae* ATCC 49619.

В ходе исследования использован заранее приготовленный МХБ и хранившийся в течение 24–48 ч. Определено, что при 2–6°С стабильность базовых растворов тигециклина без оксиразы сохраняется не более 5 ч, а с 5 и 8% оксиразы увеличивается до 16 сут. При хранении данных растворов без оксиразы при –70°С их стабильность увеличивается до 43 сут, а с добавлением 5 и 8% оксиразы — минимум до 48 нед. Полученные результаты коррелируются с опубликованными данными [12, 14, 16], в которых показано, что активность тигециклина



Зависимость значений МПК тигециклина для *E. coli* ATCC 25922 (*а*), *S. aureus* ATCC 29213 (*б*), *E. faecalis* ATCC 29212 (*в*) и *S. pneumoniae* ATCC 49619 (*г*) от концентрации оксиразы, добавленной в базовые растворы антибиотика, и сроков их хранения при 2–6°C.

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-690

Таблица 3. Сроки хранения при 2–6°C базовых растворов тигециклина при различных концентрациях оксиразы, обеспечивающие получение допустимых значений МПК, сут

Тест-штаммы	Без оксиразы	Концентрация оксиразы, %			
		2	3	5	8
E. coli ATCC 25922	5 ч	7	9	16	16
S. aureus ATCC 29213	5 ч	7	8	16	16
E. faecalis ATCC 29212	4 ч	7	9	16	16
S. pneumoniae ATCC 49619	5 ч	6	8	16	16

Таблица 4. Зависимость условных значений МПК тигециклина для тест-штаммов от концентрации оксиразы в базовых растворах антибиотика и сроков их хранения при –70°C

Срок хранения базовых растворов, нед	*E. coli* ATCC 25922				*S. aureus* ATCC 29213				*E. faecalis* ATCC 29212				*S. pneumoniae* ATCC 49619			
	2%	3%	5%	8%	2%	3%	5%	8%	2%	3%	5%	8%	2%	3%	5%	8%
0	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
12	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
18	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
28	НЕ	C	C	C	НЕ	C	C	C	НЕ	C	C	C	НЕ	C	C	C
48	НЕ	НЕ	C	C	НЕ	НЕ	C	C	НЕ	НЕ	C	C	НЕ	НЕ	C	C

в МХБ сохраняется до 6 нед (42 сут) при –17–18°C, а при 4–6°C с добавлением 2% растворов оксиразы — до 7 сут (табл. 3).

В ряде публикаций авторы отмечают, что оксираза и химически чистая субстанция тигециклина — достаточно дорогостоящие продукты [12–14]. Проведённые нами расчёты затрат показали, что из 5 мг химически чистой субстанции тигециклина (по цене в среднем 45 000 руб./5 мг) можно приготовить более 200 планшетов с рабочим диапазоном концентраций тигециклина (0,06–4,00) мг/л. При этом затраты на приготовление одного планшета составят около 270 руб. (с учётом стоимости самого планшета)[8]. Метод микроразведений в бульоне является трудоёмким процессом, поэтому не каждая бактериологическая лаборатория может использовать за один опыт такое количество планшетов. Неиспользованный базовый раствор тигециклина можно разлить по аликвотам в криопробирки и хранить при отрицательных температурах до следующего использования, а дополнительное введение оксиразы позволит еще увеличить время хранения и возможность использования хранившегося 24–48 ч МХБ. Стоимость того же количества планшетов с добавлением 5% оксиразы увеличивается незначительно (в среднем на 7–10%).

[8] Merck — электронный каталог химических веществ, реагентов, расходных материалов для научных исследований и промышленности. URL: https://www.sigmaaldrich.com/RU/en/search/pz0021-5mg?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=PZ0021-5MG&type=product (дата обращения: 10.03.2025).

Заключение

Определена возможность стабилизации растворов тигециклина, хранившихся при отрицательных температурах (с добавлением оксиразы и без неё), для получения допустимых значений МПК при определении чувствительности контрольных штаммов к антимикробным препаратам. Применение данных растворов позволило снизить затраты на тестирование за счет рационального использования антибиотика. В дальнейшем будут продолжены работы по изучению возможности использования данных растворов тигециклина при тестировании клинических штаммов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Laxminarayan R., Sridhar D., Blaser M., et al. Achieving global targets for antimicrobial resistance. *Science*. 2016; 353(6302): 874–9. DOI: https://doi.org/10.1126/science.aaf9286
2. Karageorgopoulos D.E., Falagas M.E. Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Lancet Infect. Dis*. 2008;8(12):751–62. DOI: https://doi.org/10.1016/s1473-3099(08)70279-2
3. Rodríguez-Baño J., Gutiérrez-Gutiérrez B., Machuca I., et al. Treatment of infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-, AmpC-, and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2018;31(2):e00079-17. DOI: https://doi.org/10.1128/cmr.00079-17
4. IACG Discussion Paper. Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance. Reduce unintentional exposure and the need for antimicrobials, and optimize their use;2018.
5. Шедько Е.Д., Тимошина О.Ю., Азизов И.С. Молекулярная эпидемиология генов группы mcr. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2020;22(4): 287–300. Shedko E.D., Timoshina O.Yu., Azizov I.S. Molecular epidemiology of mcr group genes. *Clinical Microbiology and Anti-*

microbial Chemotherapy. 2020;22(4):287–300. DOI: https://doi.org/10.36488/cmac.2020.4.287-300 EDN: https://elibrary.ru/ycsxgu
6. Partridge S.R., Pilato V.D., Doi Y., et al. Proposal for assignment of allele numbers for mobile colistin resistance (mcr) genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 2018;73(10):2625–30. DOI: https://doi.org/10.1093/jac/dky262
7. Cheng Y., Li Y., Yu R., et al. Identification of novel tet(X3) variants resistant to tigecycline in *Acinetobacter* species. *Microbiol. Spectr*. 2022;10(6):e0133322. DOI: https://doi.org/10.1128/spectrum.01333-22
8. Tasina E., Haidich A.B., Kokkali S., et al. Efficacy and safety of tigecycline for the treatment of infectious diseases: a meta-analysis. *Lancet Infect. Dis*. 2011;11(11): 834–44. DOI: https://doi.org/10.1016/s1473-3099(11)70177-3
9. Korczak L., Majewski P., Iwaniuk D., et al. Molecular mechanisms of tigecycline-resistance among *Enterobacterales*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2024;14:1289396. DOI: https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1289396
10. He T., Wang R., Liu D., et al. Emergence of plasmid-mediated high-level tigecycline resistance genes in animals and humans. *Nat. Microbiol.* 2019;4(9):1450–6. DOI: https://doi.org/10.1038/s41564-019-0445-2
11. Liu C., Liu J., Lu Q., et al. The mechanism of tigecycline resistance in *Acinetobacter baumannii* under sub-minimal inhibitory concentrations of tigecycline. *Int. J. Mol. Sci*. 2024;25(3):1819. DOI: https://doi.org/10.3390/ijms25031819
12. Bradford P.A., Petersen P.J., Young M., et al. Tigecycline MIC testing by broth dilution requires use of fresh medium or addition of the biocatalytic oxygen-reducing reagent Oxyrase to standardize the test method. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2005;49(9):3903–9. DOI: https://doi.org/10.1128/aac.49.9.3903-3909.2005
13. Brown S.D., Traczewski M.M. Comparative *in vitro* antimicrobial activity of tigecycline, a new glycylcycline compound, in freshly prepared medium and quality control. *J. Clin. Microbiol.* 2007;45(7):2173–9. DOI: https://doi.org/10.1128/jcm.02351-06
14. Petersen P.J., Bradford P.A. Effect of medium age and supplementation with the biocatalytic oxygen-reducing reagent Oxyrase on *in vitro* activities of tigecycline against recent clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2005;49(9):3910–8. DOI: https://doi.org/10.1128/aac.49.9.3910-3918.2005
15. Jitkova Y., Gronda M., Hurren R., et al. A novel formulation of tigecycline has enhanced stability and sustained antibacterial and antileukemic activity. *PLoS One*. 2014;9(5):e95281. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095281
16. Amann L.F., Vicente E.R., Rathke M., et al. Stability studies with tigecycline in bacterial growth medium and impact of stabilizing agents. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2021;40(1):215–8. DOI: https://doi.org/10.1007/s10096-020-03970-0
17. Zhou H., Sun X., Lyu S., et al. Evaluation of tigecycline utilization and trends in antibacterial resistance from 2018 to 2021 in a comprehensive teaching hospital in China. *Infect. Drug Resist.* 2023;16:879–89. DOI: https://doi.org/10.2147/idr.s395158

Информация об авторах

Косилова Ирина Сергеевна✉ — канд. биол. наук, с. н. с. лаб. разработки питательных сред ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Московская обл., Россия, kosilova.irina@gmail.com, https://orcid.org/0000-0003-4020-0894

Домотенко Любовь Викторовна — канд. хим. наук, в. н. с. лаб. разработки питательных сред ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Московская обл., Россия, domotenko@obolensk.org, https://orcid.org/0000-0002-4785-6418

Храмов Михаил Владимирович — канд. мед. наук, зам. директора по качеству и развитию ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Московская обл., Россия, khramov@obolensk.org, https://orcid.org/0000-0002-4553-3826

Участие авторов: *Косилова И.С.* — проведение экспериментов, анализ и обобщение полученных данных, работа с источниками литературы, статистическая обработка материала, написание текста статьи; *Домотенко Л.В.* — концепция и дизайн исследования, сбор материала, статистическая обработка материала, работа с источниками литературы, написание текста статьи; *Храмов М.В.* — концепция и дизайн исследования, редактирование. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 07.05.2025;
принята к публикации 16.07.2025;
опубликована 28.08.2025

Information about the authors

Irina S. Kosilova✉ — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Nutrient medium development laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russia, kosilova.irina@gmail.com, https://orcid.org/0000-0003-4020-0894

Lyubov V. Domotenko — Cand. Sci. (Chem.), leading researcher, Nutrient medium development laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russia, domotenko@obolensk.org, https://orcid.org/0000-0002-4785-6418

Mikhail V. Khramov — Cand. Sci. (Med.), Deputy director for quality and development, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russia, khramov@obolensk.org, https://orcid.org/0000-0002-4553-3826

Authors' contribution: *Kosilova I.S.* — conducting experiments, analyzing and summarizing the data obtained, working with literature sources, statistical processing of the material, writing the text of the article; *Domotenko L.V.* — concept and design of the study, collecting material, statistical processing of the material, working with literature sources, writing the text of the article; *Khramov M.V.* — concept and design of the study, editing. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a substantial contribution to the conception of the 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 07.05.2025;
accepted for publication 16.07.2025;
published 28.08.2025

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-684

ОБЗОРЫ

Научный обзор
https://doi.org/10.36233/0372-9311-684

Использование метода нейтрализации псевдовирусов для поиска новых антивирусных препаратов

Карпенко Л.И.✉, Рудометова Н.Б., Низоленко Л.Ф., Локтев В.Б.

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

Аннотация

В последние годы в области разработки лекарственных препаратов достигнут большой прогресс, в частности, благодаря использованию методов компьютерного моделирования. Одним из ключевых этапов разработки новых антивирусных препаратов является проверка эффективности перспективных кандидатов в экспериментах *in vitro* с использованием вирусов-мишеней. Использование новых технологий для проведения первичного скрининга с применением псевдотипированных вирусов обеспечивает упрощение исследований, повышение их эффективности и соблюдение биобезопасности проводимых исследований. **Целью** данной работы является анализ исследований, в которых продемонстрировано успешное использование псевдовирусной технологии для поиска новых химиопрепаратов против ряда РНК-содержащих вирусов.

При подготовке обзора был проведён анализ литературы, представленной в базах PubMed, Scopus, Elsevier, Google Scholar по состоянию на 01.03.2025. Для поиска использовали ключевые слова: pseudovirus, virus inhibition, antiviral drugs, RNA viruses, псевдовирус, ингибирование вируса, противовирусные препараты, РНК-содержащие вирусы.

Псевдотипированные вирусы представляют собой рекомбинантные вирусные частицы, которые имеют коровые белки одного вируса, а поверхностные белки — другого, исследуемого вируса. Достоинствами псевдовирусной технологии являются её безопасность, высокий уровень воспроизводимости результатов и возможность стандартизации. Система, основанная на лентивирусах, была разработана одной из первых и по-прежнему является одной из наиболее востребованных. С помощью псевдовирусов были отобраны и исследованы молекулы-кандидаты для инфекций, вызываемых РНК-содержащими вирусами, такими как ВИЧ-1, вирус гепатита С, вирус клещевого энцефалита, вирусы гриппа птиц, SARS-CoV-2. Большинство из отобранных препаратов действуют на начальном этапе проникновения вируса в клетку-мишень. Приведённые примеры иллюстрируют существенный вклад технологии псевдовирусов в борьбу с серьёзными социально значимыми заболеваниями, вызываемыми РНК-содержащими вирусами.

Ключевые слова: *псевдовирусы, антивирусные препараты, ВИЧ-1, ортофлавивирусы, вирус гриппа, обзор*

Источник финансирования. Работа выполнена за счёт средств Государственного задания ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

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

Для цитирования: Карпенко Л.И., Рудометова Н.Б., Низоленко Л.Ф., Локтев В.Б. Использование метода нейтрализации псевдовирусов для поиска новых антивирусных препаратов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2025;102(4):482–494.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-684
EDN: https://www.elibrary.ru/VRKCFO

Original Study Article
https://doi.org/10.36233/0372-9311-684

Application of the pseudovirus-based neutralization assay in the search for new antiviral drugs

Larisa I. Karpenko✉, Nadezhda B. Rudometova, Lily F. Nizolenko, Valery B. Loktev

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

© Карпенко Л.И., Рудометова Н.Б., Низоленко Л.Ф., Локтев В.Б., 2025

Abstract
In recent years, significant progress has been made in the field of drug development, particularly due to the use of computer modeling methods. One of the key stages in the development of new antiviral drugs is testing the efficacy of promising candidates in *in vitro* experiments using target viruses. The application of new technologies for conducting primary screening with pseudotyped viruses simplifies research, increases its efficiency and ensures the biosafety of the conducted studies.
The aim of this review is to analyze previous studies that have demonstrated the successful use of pseudovirus technology for the search of new chemotherapeutic agents against a range of RNA-containing viruses.
The analysis involved the literature presented in the PubMed, Scopus, Elsevier, and Google Scholar databases as of March 1, 2025. For the search, the following keywords were used: pseudovirus, virus inhibition, antiviral drugs, RNA viruses.
Pseudotyped viruses are recombinant viral particles that have the core proteins of one virus and the surface proteins of another, studied virus. The advantages of pseudovirus technology are its safety, high level of reproducibility of results, and the possibility of standardization. The lentivirus-based system was one of the first to be developed and remains one of the most in-demand. Using pseudoviruses, candidate molecules for infections caused by RNA-containing viruses, such as HIV-1, hepatitis C virus, tick-borne encephalitis virus, avian influenza viruses, and SARS-CoV-2, have been selected and studied. Most of the selected drugs act at the initial stage of the virus entry into the target cell. The examples provided illustrate the significant contribution of pseudovirus technology in dealing with serious socially significant diseases caused by RNA-containing viruses.

Keywords: *pseudoviruses, antiviral drugs, HIV-1, orthoflaviviruses, influenza virus, review*

Funding source. The study was carried out at the expense of the funds of the State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector".

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

For citation: Karpenko L.I., Rudometova N.B., Nizolenko L.F., Loktev V.B. Application of the pseudovirus-based neutralization assay in the search for new antiviral drugs. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2025;102(4):482–494.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-684
EDN: https://www.elibrary.ru/VRKCFO

Введение

Поиск и разработка новых лекарственных препаратов для профилактики и лечения вирусных инфекций является одной из важнейших задач медицинской химии, биологии и медицины по причине широкого распространения различных социально опасных вирусных инфекций и в связи с постоянным появлением новых вирусных заболеваний [1, 2].

Прогресс в области разработки лекарственных препаратов в последние годы во многом стал возможен благодаря использованию методов компьютерного моделирования для предсказания структуры молекул мишеней и их взаимодействий с кандидатными лекарственными соединениями [3]. Присуждение Нобелевской премии в 2024 г. за развитие методов компьютерного дизайна белков и предсказания четвертичной структуры белков наглядно иллюстрирует значимость научных достижений в этой области знаний. За короткий срок с использованием программы AlphaFold2 были расшифрованы (предсказаны) более 200 млн структур белков с участием приблизительно 2 млн исследователей из 190 стран[1]. Последние достижения в области искусственного интеллекта также создают принципиально новые возможности для конструирования новых лекарственных препаратов на основе компьютерного дизайна кандидатных лекарственных соединений и белков-мишеней [3].

При этом отобранные с помощью компьютерных технологий перспективные кандидаты будущих антивирусных препаратов необходимо проверять в реальных экспериментах *in vitro* с последующим тестированием отобранных активных молекул *in vivo*. Среди социально значимых инфекционных заболеваний следует отметить инфекции, вызываемые различными вирусными агентами, такими как ВИЧ-1, гепатит С, различными патогенными ортофлавивирусами, вирусами гриппа, SARS-CoV-2 и многими другими опасными и особо опасными вирусами. Экспериментальная работа с этими патогенами требует особых условий для соблюдения строгих требований биобезопасности и отличается сложностью проведения лабораторных экспериментов, отсутствием простых и безопасных лабораторных методик для работы с инфекционными агентами, невозможностью культивирования целого ряда вирусов в лаборатории, что затрудняет проведение экспериментов или даже делает их невозможными. Принципиально важной альтернативой для первичного скрининга является использование псевдотипированных вирусов [4]. Использование псевдовирусов с ограниченной репликацией, несу-

[1] MLA style: Press release. NobelPrize.org. Nobel Prize Outreach 2025. https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2024/press-release/ (дата обращения: 02.04.2025).

© Karpenko L.I., Rudometova N.B., Nizolenko L.F., Loktev V.B., 2025

DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-684

щих белки вирусной оболочки, представляет собой безопасный и полезный метод, широко применяемый вирусологами для изучения, поиска и создания новых антивирусных химиопрепаратов.

Цель обзора — изучить исследования, в которых продемонстрировано успешное использование псевдовирусной технологии для поиска новых химиопрепаратов против ряда РНК-содержащих вирусов.

При подготовке обзора был проведён анализ литературы, представленной в научных базах PubMed, Scopus, Elsevier, Google Scholar по состоянию на 01.03.2025. Для поиска использовали ключевые слова: pseudovirus, virus inhibition, antiviral drugs, RNA viruses, псевдовирус, ингибирование вируса, противовирусные препараты, РНК-содержащие вирусы.

В научной электронной базе PubMed при поиске с использованием сочетания ключевых слов было найдено 293 источника, из них 228 — с полным текстом в открытом доступе. Подобным образом поиск был проведён также с помощью научных баз Scopus, Elsevier, Google Scholar, но для них дата публикации статьи была ограничена 2023–2024 гг. с целью не пропустить наиболее актуальные исследования. В целом в ходе поиска литературы в перечисленных базах данных на русском и английском языках, проводившегося с учётом таких критериев отбора, как год издания и доступность публикаций к прочтению, было проанализировано около 1700 источников, соответствующих тематике. В связи с ограничением по объёму статьи для исследования было отобрано 68 источников.

Псевдовирусы

Псевдовирусы — это искусственно созданные вирусы с дефектным геномом, которые, благодаря аналогичным конформационным структурам поверхностных гликопротеинов, способны проникать в восприимчивые клетки так же, как это делают природные вирусы [5–7]. В отличие от вирусов, псевдовирусы могут реплицироваться, как правило, только в течение одного цикла репликации [7, 8]. Ограничение репликации делает проведение экспериментов с ними безопасным и обеспечивает новые возможности для исследования высокопатогенных РНК-содержащих вирусов. Важно отметить, что использование псевдовирусов позволяет проводить исследования даже в случае, когда природные вирусы невозможно или очень сложно культивировать в лабораторных условиях [9].

Ещё раз подчеркнём, что, в отличие от инфекционных вирусов, работа с псевдовирусами безопасна, поскольку в кодирующие области генома внесены изменения (мутации), ограничивающие развитие вируса только одним циклом размножения, поэтому псевдовирусы нередко называют «вирусами одного цикла инфекции». Как правило, псевдотипированные вирусы несут маркерные гены (например, люциферазу или *gfp*), что позволяет проводить более лёгкую и точную количественную оценку при экспериментах с ними.

Таким образом, достоинствами псевдовирусной технологии являются безопасность, высокий уровень воспроизводимости результатов, возможности стандартизации и получения новых вариантов псевдовирусов для дальнейшего развития исследований. Это предопределяет широкое использование исследователями данной технологии для изучения особенностей проникновения вирусов в клетки-мишени, определения наличия вируснейтрализующих антител, поиска и разработки новых антивирусных препаратов.

Некоторые особенности конструирования псевдовирусов

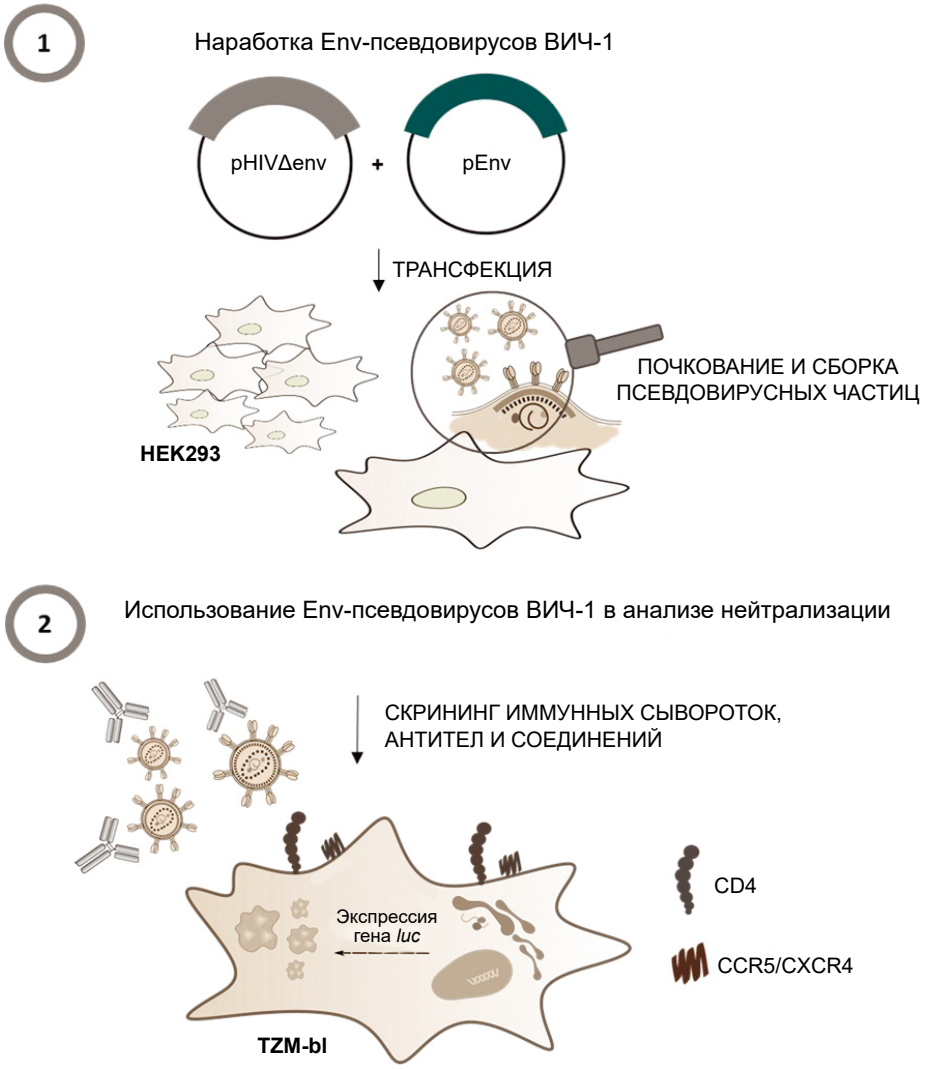
Наиболее часто псевдовирусы разделяются на три основных типа: с лентивирусным геномом (ВИЧ-1), с геномом вируса везикулярного стоматита и с геномом вируса лейкемии мышей [10]. Система, основанная на лентивирусах, в частности Env-псевдовирусы ВИЧ-1, была разработана одной из первых для анализа иммунного ответа на вакцины против ВИЧ-1 и поиска противовирусных препаратов [11]. Она по-прежнему является одной из наиболее востребованных и часто используемой в исследованиях.

Env-псевдовирусы ВИЧ-1 представляют собой рекомбинантные вирусные частицы, которые получают путем трансфекции эукариотических клеток двумя плазмидами: коровой и оболочечной. Коровая плазмида содержит гены структурных, регуляторных и вспомогательных белков ВИЧ-1, необходимые для сборки вирусных частиц, а также последовательности, необходимые для упаковки вирусной РНК (Ψ); а оболочечная плазмида, в свою очередь, несет ген поверхностного гликопротеина (*env*) определённого подтипа ВИЧ-1. В результате трансфекции формируются вирусные частицы с дефектным геномом, не способным обеспечить сборку инфекционных дочерних вирионов при заражении [12, 13]. При работе с Env-псевдовирусами ВИЧ-1 используют генно-модифицированную клеточную линию TZM-bl, являющуюся производной клеточной линии HeLa и несущую на своей поверхности рецепторы CD4 и корецепторы CCR5 и CXCR4, которые ВИЧ-1 использует для проникновения в клетки-мишени. Важной особенностью клеточной линии TZM-bl является наличие интегрированных репортерных генов люциферазы светлячка и β-галактозидазы *Escherichia coli* под транскрипционным контролем длинного концевого повтора ВИЧ-1, белковые продукты которых используют для детекции проникновения Env-псевдовирусов

ВИЧ-1 в клетки-мишени. Так, при проникновении псевдовируса в клетку-мишень TZM-bl в ответ на синтез вирусного белка Tat запускается экспрессия репортерных генов, которая, например, для гена люциферазы регистрируется с помощью люминометра. При этом высокая интенсивность люминесценции соответствует проникновению псевдовирусных частиц в клетки-мишени, а подавление люминесценции, наоборот, указывает на нейтрализацию Env-псевдовирусов ВИЧ-1 [14, 15]. На **рисунке** представлен общий принцип работы Env-псевдовирусов ВИЧ-1.

Заменяя ген *env* в лентивирусной системе на гены белков оболочки других вирусов, можно получать лентивирусные частицы, экспонирующие на поверхности соответствующие вирусные белки. С использованием этой технологии были получены псевдовирусы таких оболочечных РНК-вирусов, как вирусы гриппа [16], коронавирусы [3], ретровирусы [17], флавивирусы [18] и др., которые успешно применяются в исследованиях.

Псевдовирусная платформа в равной степени может быть также полезна для изучения проникновения в клетки вирусов, которые быстро накапливают мутации в результате адаптации в культуре из-за отсутствия селекционного давления, такого как иммунные реакции хозяина, существующего *in vivo*. Например, исследования *in vitro* с использованием живого ВИЧ-1 привели к тому, что из-за подверженной ошибкам природы обратной транскриптазы возникли мутации в гликопротеине Env, что обеспечило адаптацию к культуре тканей и привело к фенотипическим изменениям. В результате проникновение в клетки адаптированных к культуре



Общий принцип работы Env-псевдовирусов ВИЧ-1 ([4], с изменениями).

Практическая работа с Env-псевдовирусами ВИЧ-1 включает два основных этапа: 1-й этап — сборка вирусных частиц с помощью трансфекции клеточной линии HEK293 с использованием двух плазмид: коровой (pHIVΔenv) и оболочечной (pEnv); 2-й этап — анализ нейтрализации с использованием химиотерапевтических агентов с целью определения их способности блокировать проникновение псевдовирусов в клетку-мишень.

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-684

штаммов ВИЧ-1 не соответствовало происходящему при естественной инфекции у людей и, таким образом, не давало клинически значимой модели [19].

Отметим, что, несмотря на перечисленные преимущества, система псевдовирусов имеет и ряд ограничений, которые следует иметь в виду при проведении любых исследований. Эта система в первую очередь предназначена для имитации процесса проникновения вирусного агента в клетку *in vitro*, однако процесс пролиферации и высвобождения вирусных частиц смоделирован быть не может. Распределение, конформация и плотность гетерологичных вирусных гликопротеинов на псевдовирусах не всегда могут отражать их «естественное» состояние на поверхности нативных вирусных частиц [13].

Поэтому результаты анализов с использованием псевдотипированных вирусов не всегда могут совпадать с данными, полученными с помощью анализа нативных вирусов [13]. Наконец, использование псевдовирусов эффективно при изучении оболочечных вирусов. Для таких вирусов, как, например, ротавирус и полиовирус, система псевдовирусов функционирует неудовлетворительно [7]. Для решения последней проблемы была разработана самоорганизующаяся псевдовирусная система, но здесь она рассматриваться не будет.

В данном обзоре будет проведён анализ и обобщение результатов использования технологии псевдовирусов для поиска препаратов против ВИЧ-1, ортофлавивирусов и вирусов гриппа птиц.

Псевдовирусы и противовирусные препараты

Антивирусные препараты, ингибирующие проникновение ВИЧ (Riboviria, Pararnavirae, Artverviricota, Revtraviricetes, Ortervirales, Retroviridae, Orthoretrovirinae, Lentivirus)

В настоящее время основой терапии пациентов с ВИЧ-инфекцией является антиретровирусная терапия — комбинация нескольких противовирусных препаратов, которые подавляют размножение вируса, воздействуя на разные этапы его жизнедеятельности, тем самым сохраняя иммунологические функции организма и снижая риск передачи вируса [20]. Однако распространение резистентности ВИЧ к антиретровирусным препаратам снижает эффективность лечения и увеличивает смертность от ВИЧ/СПИДа [21].

Нацеливание на начальный этап проникновения вируса в клетку-мишень даёт ряд преимуществ по сравнению с другими этапами жизненного цикла ВИЧ-1 [22]. Во-первых, генетический материал вируса не может интегрироваться в геном клетки хозяина. Во-вторых, ингибиторам проникновения не нужно преодолевать мембрану клетки, в отличие от ингибиторов обратной транскриптазы, интегразы или протеазы. В-третьих, поскольку проникновение вируса состоит из отдельных этапов, существует несколько мишеней для ингибиторов проникновения, что является гарантией от перекрёстной резистентности [23].

Важным моментом для поиска таких препаратов является то, что ВИЧ-1 для проникновения в клетку требуются корецепторы, и это увеличивает список мишеней для противовирусных препаратов [24]. Среди первых эффективных ингибиторов проникновения ВИЧ-1 был препарат маравирок [25]. Препарат связывается с CCR5, тем самым блокируя последующие этапы слияния вирусной и клеточной мембран и, следовательно, проникновение вируса в клетки-мишени. В этом случае ВИЧ-1 не может проникнуть в человеческие макрофаги и Т-лимфоциты. Однако маравирок может вызывать серьёзные, опасные для жизни побочные эффекты. Этот факт ещё раз подчёркивает необходимость разработки новых ингибиторов проникновения ВИЧ-1.

Технология псевдовирусов широко используется для изучения препаратов, блокирующих связывание вируса с мембранными рецепторами и его проникновение внутрь клеток-мишеней. Перечень таких препаратов приведён в **табл. 1**.

Энфувиртид (T20), который довольно долгое время оставался единственным ингибитором слияния вирусов, используемым в комбинированной терапии ВИЧ-инфекции, является пептидным препаратом, но он имеет относительно низкую противовирусную активность и легко вызывает лекарственную устойчивость. Активность липопептидных ингибиторов, разработанных на основе T20, значительно выше. Их разработке, анализу структуры, функции и сравнению активности в подавлении проникновения ВИЧ-1 и псевдовируса в клетки посвящена работа [26].

Ещё одним примером может служить искусственный пептид HNG-105, созданный путём клик-конъюгации линейного пептида 12p1 (RINNIPWSEAMM). HNG-105 изучили с помощью спектроскопии поверхностного плазмонного резонанса и анализов ингибирования псевдовируса. Результаты показывают, что молекула HNG-105 может быть эффективна в отношении подтипов ВИЧ-1, и подчёркивают её потенциал в качестве лидера для разработки терапевтических и микробицидных агентов, помогающих бороться с распространением СПИДа [27].

Ингибиторы проникновения ВИЧ разрабатывались также на основе нуклеиновых кислот. Так, были выделены и изучены 23 клона РНК-аптамеров против псевдотипированного вируса HIV-1CAP45, который относится к вирусам подтипа C, эндемичным в странах Африки к югу от Сахары и ответственным за большинство случаев заражения ВИЧ-1 в мире. Аптамеры ингибировали заражение целевых

Таблица 1. Антивирусные препараты против ВИЧ-1, полученные и/или исследованные с использованием псевдовирусной технологии

Вещество	Механизм действия	Источник
Липопептиды на основе T20 (энфувиртида)	Ингибитор слияния	[27]
HNG-105 — модификация линейного пептида 12p1 (RINNIPWSEAMM)	Ингибирование gp120 путём взаимодействия с сайтом, отличным от сайта связывания CD4 или корецептора, что приводит к резкому снижению сродства gp120 к любому из его рецепторов	[28]
РНК аптамеры	Связывание с гликопротеинами gp120 или gp41 и другими молекулами вирусной поверхности	[29]
ДНК-триплексы с гидрофобными модификациями	Взаимодействие с первичным карманом в повторе N-гептады гликопротеина 41 (gp41)	[30]
Тиолированные производные пиримидина	Избирательное ингибирование, зависящее от предпочтения корецептора псевдовируса	[31]
Малые молекулы NBD-14009 и NBD-14010 аналоги N-фенил-N'-(2,2,6,6-тетраметил-пиперидин-4-ил)-оксаламида	Ингибирование слияния клеток и передачи ВИЧ-1 от клетки к клетке I	[32]
Метилгаллат из съедобного гриба *Pholiota adiposa*	Ингибирование репликации ВИЧ-1 в клетках TZM-BL, инфицированных псевдовирусом, блокирущее как процесс проникновения вируса, так и активность ключевых ферментов, необходимых для его жизненного цикла	[36]
DAVEI — рекомбинантная пептидная химера лектина циановирина-N (CVN) и gp41 ВИЧ-1	Связывание gp120 и gp41	[40]
Катехин из *Peltophorum africanum*	Не описан	[37]
Метаноловый экстракт корня *Elaeodendron transvaalense*	Не описан	[37]
Перколяционный экстракт *Spatholobus suberectus* Dunn	Взаимодействие с гликопротеином оболочки вируса gp160	[38]
Глицивир — смесь производных никотиновой и глицирризиновой кислот	Препятствует проникновению вируса в целевую клетку	[34]

клеток, связываясь как с разными молекулами гликопротеинов (gp120 или gp41), так и с другими молекулами вирусной поверхности, необходимыми для инфицирования. Таким образом, они могут использоваться в качестве аналитических инструментов для исследования механизмов проникновения ВИЧ-1 и в качестве ингибиторов этого процесса [28]. Другую категорию ингибиторов ВИЧ-1 могут представлять комплексы на основе ДНК-триплексов с гидрофобными модификациями, взаимодействующие с первичным карманом в повторе N-гептады гликопротеина 41 (gp41). С использованием Env-псевдовирусов продемонстрировано, что триплексы являются ингибиторами слияния вируса с клетками [29].

В качестве потенциальных ингибиторов проникновения ВИЧ-1 были исследованы и искусственные химические соединения. Были синтезированы тиолированные производные пиримидина и количественно определён их антиретровирусный эффект против вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1IIIB) и химерных псевдовирионов ВИЧ-1 в анализах вирусной инфекционности, включая анализ ингибирования синцития, а также анализ вирусной инфекции одного цикла на клетках HeLaCD4-LTR/β-gal. Ингибирование было избирательным и зависело от предпочтения корецептора псевдовируса [30].

Путём целевого скрининга коммерческих библиотек в 2005 г. были выделены малые молекулы, аналоги N-фенил-N'-(2,2,6,6-тетраметил-пиперидин-4-ил)-оксаламида, как новый класс ингибиторов проникновения ВИЧ-1, которые блокировали взаимодействие gp120-CD4 [31]. Однако они имели ряд существенных недостатков. Следующее десятилетие данная группа учёных последовательно изучала и модифицировала эти вещества, и в конечном итоге были получены малые молекулы NBD-14009 и NBD-14010, протестированные против панели из 51 Env-псевдовирусов ВИЧ-1, представляющих различные подтипы клинических изолятов. Эти соединения имели противовирусную активность в наномолярном диапазоне ($IC_{50} \approx 150$ нМ). Также они ингибировали слияние клеток и передачу ВИЧ-1 от клетки к клетке [32].

Особого внимания заслуживают работы, посвящённые природным соединениям, нацеленным на этап проникновения ВИЧ-1 в клетки-мишени. Препарат глицивир — многокомпонентная смесь, содержащая моно-, ди-, три- и тетраникотинаты глицирризиновой кислоты, проявил выраженную ингибирующую активность против псевдовирусов ВИЧ-1 подтипов B, A6 и рекомбинантной формы CRF63_02A (диапазон IC_{50} 3,9–27,5 мкМ). Анализ ингибирующей активности глицивира в зависимо-

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-684

сти от времени его добавления к Env-псевдовирусам ВИЧ-1 и клеткам-TZM-bl позволил предположить, что данный препарат действует на этапе проникновения вируса в клетку-мишень [33]. Позднее была разработана модифицированная методика синтеза препарата глицивира, которая позволила заменить исходные реагенты на менее токсичные и более дешёвые и получить препарат, по биологической активности приближенный к исходному глицивиру [34].

C.R. Wang и соавт. была продемонстрирована противовирусная активность метилгаллата из съедобного гриба *Pholiota adiposa* [35]. Метилгаллат подавлял проникновение Env-псевдовируса в клетки TZM-bl, при этом он обладал низкой токсичностью в отношении использованных культур клеток. Для идентификации ингибирующих веществ из растений был создан псевдовирус ВИЧ-1 подтипа C (HIV-1-C), а в качестве контроля были использованы псевдовирусы дикого типа ВИЧ-1 подтипа B (HIV-1-B) и мутанты, устойчивые к нуклеозидным и ненуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы. Так, катехин, полученный из *Peltophorum africanum*, ингибировал проникновение псевдовирусов ВИЧ-1-C и ВИЧ-1-B с индексами селективности 6304 мкМ (IC_{50}: 0,49 мкМ, CC_{50}: 3089 мкМ) и 1343 мкМ (IC_{50}: 2,3 мкМ, CC_{50}: 3089 мкМ) соответственно [36]. Широчайшим спектром противовирусной активности обладает перколяционный экстракт *Spatholobus suberectus Dunn* (SSP) против проникновения SARS-CoV, H5N1 IAV и ВИЧ-1. В частности, в случае ВИЧ-1 SSP взаимодействовал с гликопротеином gp160 оболочки вируса, который отвечает за проникновение вируса в клетки-мишени хозяина [37].

Новые противовирусные препараты, способные инактивировать инфекционную активность вирусных частиц, получили название инактиваторы. В отличие от ингибиторов слияния и антагонистов рецепторов, инактиваторы могут активно инактивировать вирионы в крови посредством взаимодействия с одним или несколькими участками гликопротеинов вирусной оболочки. Предполагается, что ряд разрабатываемых инактиваторов вирусов на основе белков и пептидов могут быть безопасными при их применении для лечения человека [38]. Например, рекомбинантная химера, обозначенная как DAVEI (двойной ингибитор вируцидного проникновения), состоящая из лектина циановирина-N (CVN) и пептида консервативной мембранно-проксимальной внешней области белка оболочки ВИЧ-1 gp41 (MPER), могла эффективно инактивировать псевдовирус ВИЧ-1 Bal.01 со значением EC_{50} 28,3 нМ. Необратимая инактивация вирионов ВИЧ-1 происходила при двойном взаимодействии с gp120 и gp41. При этом сами исходные молекулы CVN или MPER не способны инактивировать вирионы ВИЧ-1 [39].

Антивирусные препараты, ингибирующие ортофлавивирусы

Ещё одним семейством РНК-содержащих вирусов, имеющих громадное медицинское значение, являются вирусы, относящиеся к семейству Flaviviridae (*Riboviria, Orthornavirae, Kitrinoviricota, Flasuviricetes, Amarillovirale, Flaviviridae*). Сегодня к семейству флавивирусов относят более 90 видов вирусов и множество новых, ещё неклассифицированных вирусов. Важно отметить, что в настоящее время ортофлавивирусы распространены практически глобально, и сотни миллионов человек ежегодно встречаются с ними, многие заболевают и даже погибают. Принято выделять так называемые большие флавивирусные инфекции, которые вызывают вирусы денге, японского энцефалита, Западного Нила, жёлтой лихорадки и Зика.

Вирус гепатита C (HCV), который также входит в отдельный род семейства *Flaviviridae*, является виновником около 170 млн случаев заболевания человека. Заболевание часто протекает в хронической форме, кончается трагически, а вирус гепатита C вполне заслуженно получил неофициальное название «ласковый убийца» [40]. Это единственный представитель ортофлавивирусов, против которых существуют официально зарегистрированные высокоэффективные лекарственные препараты, приводящие в большинстве случаев к излечению пациентов. К ним относятся ингибиторы протеазы HCV боцепривир и телапривир [41], а также даклатасвир, софосбувир и симепревир, нацеленные на вирусные ферменты — полимеразу NS5 или протеазу NS3. Они обеспечивают высокоэффективную антивирусную терапию у подавляющего большинства пациентов [42]. Однако в некоторых случаях такая терапия сопровождается неблагоприятными побочными эффектами [43]. Поэтому поиск препаратов против вируса гепатита C остается актуальной проблемой. Так, целый ряд работ был посвящён веществам, направленным против вируса гепатита C. Было продемонстрировано, что гарциановые кислоты A и B, выделенные из грибка *Trichoderma harzianum*, могут воздействовать на белок оболочки HCV E1/E2, а также CD81 клеток-хозяев, ингибируя проникновение псевдовирусов в клетки и обладая низкой цитотоксичностью [44]. На той же модели HCVpp было показано, что растительный алкалоид берберин проявляет противовирусную активность, взаимодействуя с гликопротеинами E1 и E2 оболочки HCV [45]. С помощью псевдотипированного вируса HCV выяснили, что LUMS1 — модифицированная форма лектина микровирина, известного как ингибитор проникновения ВИЧ-1, может столь же эффективно ингибировать и проникновение HCVpp в клетки-мишени хозяина [46]. Пангенотипическое проникновение псевдочастиц HCV в гепатоциты человека Huh7 ингибировали и про-

изводные схизандроновой кислоты, тритерпеноида из плодов *Schisandra sphenanthera*, препятствуя слиянию вириона и клеточной мембраны и не проявляя заметной цитотоксичности. Эти соединения продемонстрировали также сильную противоопухолевую активность против линий клеток Bel7404 и SMMC7721 [47]. Несколько производных флавоноидов, в которых триазольные группы были объединены с пиранофлавоноидным каркасом, ингибировали инфекцию клеток Huh7 вирусом гепатита С. Дополнительные исследования механизма действия с использованием псевдовирусов подтвердили, что наиболее эффективные из этих соединений ингибировали именно проникновение вируса в клетку [48]. Важно отметить, что вирус гепатита С фактически не культивируется в лабораторных условиях на культурах клеток. Успехи в создании антивирусных препаратов против HCV во многом были предопределены развитием и использованием технологий псевдовирусов для оценки антивирусной активности кандидатных соединений.

Псевдотипированные частицы были созданы и для других вирусов этого семейства, преимущественно с использованием лентивирусной системы, а именно: инфекционный псевдотипированный вирус гепатита С HCVpp, несущий немодифицированные гликопротеины HCV E1 и E2 [49], псевдотипированные вирусы японского энцефалита [50, 51], псевдотипированные вирусы денге D2(HIVluc) [52] и Зика — ZikaEnv/HIV-1 [53].

Псевдотипированные вирусы широко использовались для изучения рецепторного взаимодействия между поверхностными белками ортофлавивирусов с клетками хозяина, а также поиска и исследования механизма действия противовирусных препаратов [54]. Перечень таких препаратов приведён в **табл. 2**.

T. Pan и соавт. показали, что несколько нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП), включая аспирин, ибупрофен, напроксен, ацетаминофен и лорноксикам, эффективно подавляют проникновение псевдотипированных вирусов Зика Env/HIV-1, как и репликацию вируса Зика в клеточных линиях и в первичных эндотелиальных клетках плода человека [53]. Интересно, что НПВП-ингибирующий эффект был опосредован эффективным снижением экспрессии клеточного белка AXL — кофактора проникновения вируса Зика. Таким образом, был описан новый механизм действия противовирусных соединений, который включает блокаду проникновения вируса Зика посредством деградации кофактора проникновения вируса в клетку. Авторы пришли к выводу, что НПВП могут быть использованы на практике для профилактики заражения вирусом Зика у беременных женщин, поскольку некоторые НПВП, включая ибупрофен и ацетаминофен, считаются клинически безопасными.

Антивирусные препараты, ингибирующие проникновение вирусов гриппа

Вирусы гриппа — высококонтагиозные респираторные патогены человека, принадлежащие к семейству Orthomyxoviridae (*Riboviria, Orthornavirae, Negarnaviricota, Polyploviricotina, Insthoviricetes, Articulavirales, Orthomyxoviridae)*. Семейство содержит четыре рода РНК-содержащих вирусов с сегментированным геномом: *Alphainfluenzavirus, Betainfluenzavirus, Deltainfluenzavirus* и *Gammainfluenzavirus.* Фактически каждый род включает один вид вируса: вирус гриппа А (*Alphainfluenzavirus influenza*), вирус гриппа В (*Betainfluenzavirus influenza*), вирус гриппа С (*Gammainfluenzavirus influenzae*) и вирус гриппа D (*Deltainfluenzavirus influenza)*. С заболеваниями человека в основном ассоциируются с вирусами гриппа А, В и С, хотя семейство Orthomyxoviridae включает еще 5 родов вирусов.

На липидной оболочке вирусов гриппа доминируют два основных мембранных гликопротеина: гемагглютинин (HA) и нейраминидаза (NA). Поверхностный гликопротеин HA отвечает за при-

Таблица 2. Антивирусные препараты против флавивирусов, полученные и/или исследованные с использованием псевдовирусной технологии

Вещество	Инфекция	Механизм действия	Источник
НПВП (аспирин, ибупрофен, напроксен, ацетаминофен, лорноксикам)	Зика	Снижение экспрессии клеточного белка AXL, кофактора проникновения ZIKV	[54]
Гарциановые кислоты А и В из *Trichoderma harzianum*	Гепатит С*	Воздействие на белок оболочки вируса E1/E2, а также CD81 клеток-хозяев	[45]
Берберин (растительный алкалоид)	Гепатит С	Взаимодействие с гликопротеинами E1 и E2	[46]
LUMS1 — модифицированная форма микровирина (лектин)	Гепатит С	Взаимодействие с гликопротеинами E1 и E2	[47]
Производные схизандроновой кислоты (тритерпеноида из плодов *Schisandra sphenanthera*	Гепатит С	Препятствуют слиянию вириона и клеточной мембраны	[48]

Примечание. *Псевдовирус собран на базе генома вируса везикулярного стоматита. Все остальные псевдовирусы сконструированы на базе генома ВИЧ-1.

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-684

крепление вирусной частицы и проникновение в клетки хозяина через рецепторы сиаловой кислоты, а NA своей ферментативной активностью обеспечивает высвобождение вирусного потомства из инфицированной клетки. Подтипы (серотипы) вируса гриппа А принято классифицировать в комбинации 18 типов HA и 11 типов NA [55].

Помимо вакцинации, для лечения и профилактики инфекции вируса гриппа А применяются противовирусные препараты. Поиску таких препаратов и изучению механизмов их действия с использованием псевдовирусных частиц посвящён ряд работ. Перечень таких препаратов приведён в **табл. 3**.

Лентивирусные псевдовирусные системы были разработаны для SARS-CoV, SARS-CoV-2 и птичьего гриппа H5 [56]. Однако две другие платформы — с геномом вируса везикулярного стоматита и геномом вируса лейкемии мышей — также используются в исследованиях [57].

A. Antanasijevic и соавт., анализируя проникновение псевдовируса, созданного на базе ВИЧ-1, выяснили, что малая молекула трет-бутилгидрохинона (TBHQ) ингибирует проникновение в клетки вируса гриппа, опосредованное HA типа H7, а также HA H3. Используя ядерно-магнитный резонанс, авторы показали, что ароматическое кольцо TBHQ имеет обширный контакт с областью петли стебля H7 HA [58].

Скрининг на основе псевдовирусов позволил идентифицировать два суперкоротких мембранно-активных липопептида (C12-KKWK и C12-OOWO) в качестве эффективных анти-IAV-агентов против штаммов гриппа A/Puerto Rico/8/34 и A/Aichi/2/68. Ингибирование проникновения вируса происходило путём взаимодействия этих соединений с субъединицей HA2 [59].

T.C. Hung и соавт. был проведён скрининг ряда препаратов и обнаружено, что кверцетин (витамин группы P) ингибирует проникновение в клетку псевдовирусов, экспонирующих HA вируса H5N1 [48]. Исследования показали, что кверцетин взаимодействует с субъединицей HA2 на ранней стадии заражения гриппом и это обеспечивает возможность его применения для разработки эффективных, безопасных и доступных натуральных продуктов для лечения и профилактики гриппа А [60].

Серия олиготиофеновых соединений, нацеленных на HA вируса гриппа, была синтезирована в качестве специфических ингибиторов против подтипа H5 с помощью серии реакций алкилирования, азидирования, аминирования и амидирования. Ингибирующая активность этих соединений была протестирована на клеточном уровне против псевдовируса гриппа H5N1. Анализ структуры этих соединений показал, что размер олиготиофеновых соединений очень важен для уровня их ингибирующей активности [61].

Была оценена противогриппозная активность производных пиразоло[3,4-b]пиридинонов, синтезированных с помощью оригинального протокола с использованием воды в качестве растворителя. Протокол позволял получать модифицированные варианты соединений в течение 1 ч. Результаты скрининга полученных соединений выделили два производных, которые проявили сильную ингибирующую активность против псевдовируса A/Thailand/Kan353/2004. Быстрота и экологичность

Таблица 3. Антивирусные препараты против вирусов гриппа А, полученные и/или исследованные с использованием псевдовирусной технологии

Вещество	Штамм гриппа	Механизм действия	Источник
Малая молекула TBHQ	H7 A/Netherlands/219/2003, H3 A/Brisbane/10/2007	Ароматическое кольцо TBHQ имеет обширный контакт с областью петли стебля HA	[59]
C12-KKWK и C12-OOWO — мембранно-активные липопептиды	A/Puerto Rico/8/34, A/Aichi/2/68	Взаимодействие с субъединицей HA2	[60]
Кверцетин (витамин группы P)	A/Anhui/1/2005A, A/Xinjiang/1/2006, A/Hong Kong/156/1997, A/Qinghai/59/2005, A/Thailand/Kan353/2004, A/VietNam/1194/2004	Взаимодействие с субъединицей HA2 вируса A (H5N1), которая опосредует слияние вирусной оболочки с эндосомальной мембраной на ранней стадии заражения	[61]
Олиготиофеновые соединения	H5N1	Связывание с HA	[62]
Производные пиразоло[3,4-b]пиридинонов	H5N1-A/Thailand/ Kan353/2004	Связывание HA	[63]
Пентациклические тритерпеновые сапонины C-28	A/Duck/Guangdong/99	Связывание с HA	[64]
Перколяционный экстракт *Spatholobus suberectus* Dunn	H5N1Turkey	Прямое связывание гликопротеинов вирусной оболочки	[38]
Гриффитсин из красных водорослей, и его модификация GL25E	H1N1: Puerto Rico/8/1934, California/07/2009, Shanghai/37T/2009, WSN/1933. H3N2: Guizhou/54/1989	Связывание с HA на стадии проникновения вируса	[65]

синтеза этих производных открывает новые перспективы в области разработки лекарственных препаратов [62].

Ряд модифицированных пентациклических тритерпеновых сапонинов C-28 был синтезирован посредством конъюгации с амидными производными, и была оценена их противовирусная активность против вируса гриппа A/Duck/Guangdong/99 в клетках MDCK. Исследование механизмов действия показало, что эти тритерпеноиды могут прочно связываться с HA вирусной оболочки, блокируя прикрепление псевдовируса H5N1 к клеткам-мишеням [63].

После начала пандемии COVID-19 препараты, ингибирующие проникновение вирусов гриппа, практически всегда исследовались совместно с препаратами против SARS-CoV-2. Особенно пристальное внимание стало уделяться не химически синтезированным, а природным соединениям, поскольку натуральные противовирусные препараты были признаны безопасными и эффективными.

Например, уже упомянутый перколяционный экстракт *Spatholobus suberectus Dunn* (SSP) является ингибитором проникновения вируса широкого спектра действия против SARS-CoV-1/2 и других оболочечных вирусов. Ингибирующая активность SSP в отношении вирусов была оценена с использованием псевдотипированных SARS-CoV-1 и 2, HIV-1ADA и HXB2, а также H5N1.

Исследования *in vivo* показали, что даже при длительном лечении препарат не проявлял токсичности для подопытных крыс, по сравнению с животными контрольной группы. Полученные данные демонстрируют потенциал SSP как препарата-кандидата для профилактики и лечения инфекций, вызванных оболочечными вирусами [36].

Гриффитсин — белок, связывающий углеводы, выделенный из красных водорослей, а также двухвалентный ингибитор проникновения, созданный на его основе (GL25E), — рекомбинантный белок, состоящий из гриффитсина, линкера из 25 аминокислот, и EK1 — ингибитора коронавируса широкого спектра действия, могут эффективно ингибировать моноинфекцию вируса гриппа A и SARS-CoV-2 и их микст-инфекцию путём блокирования HA IAV и спайкового белка SARS-CoV-2. GL25E более эффективен, чем гриффитсин, поскольку GL25E также может взаимодействовать с доменом HR1 в белке S SARS-CoV-2 [64].

Следует отметить, что наибольшее количество исследований, связанных с поиском противовирусных препаратов с помощью технологии псевдовирусов, связано с пандемией COVID-19, вызванного коронавирусом SARS-CoV-2, которая породила настоящий бум вирусологических исследований. Опубликован ряд обзорных публикаций, посвящённых возможностям использования псевдовирусов в исследовании коронавирусных инфекций [8, 9, 65, 66]. В данных публикациях подчёркивается значимость использования псевдовирусов для исследования особенностей взаимодействия SARS-CoV-2 с пермиссивными клетками, количественного определения вируснейтрализующих антител, новых возможностях для конструирования вакцин, поиска новых антивирусных препаратов на основе оценки активности химически синтезированных соединений, исследований особенностей поведения псевдовирусных частиц в целом организме и их взаимодействии с различными органами и иммунной системой. Основные ограничения использования этой технологии связываются с ограничением представленности белков коронавируса на поверхности псевдовирусной частицы и невозможности использования для исследования неструктурных белков SARS-CoV-2. В целом количество публикаций по псевдовирусам и SARS-CoV-2 огромно и нуждается в отдельном рассмотрении.

Заключение

Проведён анализ использования псевдовирусов для создания новых средств диагностики, профилактики и лечения для ряда серьёзных социально значимых инфекционных заболеваний, вызываемых РНК-содержащими вирусами, на основе данных, опубликованных в последние годы. В настоящее время технологии с использованием псевдовирусов широко и успешно используются для исследований ВИЧ-1, вируса гепатита C, вируса клещевого энцефалита, вирусов гриппа птиц и SARS-CoV-2, а также вирусов особо опасных инфекций, например, вирусов лихорадок Марбург и Эбола [67, 68].

Успех использования псевдовирусов определяется принципиально новыми возможностями этой технологии:

- позволяет проводить исследования начального этапа проникновения вируса в клетку;
- выполнять исследования в условиях, обеспечивающих высокий уровень биобезопасности, особенно при работе с псевдовирусами, моделирующими высокопатогенные вирусные агенты;
- принципиально упрощает выполнение исследований и делает их возможными, особенно для плохо культивируемых или не культивированных вирусов;
- расширяет экспериментальные возможности исследователей;
- успешно сочетается с современными методами синтетической биологии и биоинформатики.

Совокупность представленных данных иллюстрирует принципиально новый вклад технологии псевдовирусов в поиск и создание нового поколения лекарственных препаратов для борьбы с серьёз-

ными социально значимыми заболеваниями, вызываемыми РНК-содержащими вирусами.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Sagaya Jansi R., Khusro A., Agastian P., et al. Emerging paradigms of viral diseases and paramount role of natural resources as antiviral agents. *Sci. Total. Environ*. 2021;759: 143539. DOI: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143539
2. Sharma K., Singh M., Sharma S.C. Revolutionizing antiviral therapeutics: in silico approaches for emerging and neglected RNA viruses. *Curr. Pharm. Des*. 2024;30(41):3276–90. DOI: https://doi.org/10.2174/0113816128322226240815063730
3. Singh S., Kaur N., Gehlot A. Application of artificial intelligence in drug design: A review. *Comput. Biol. Med*. 2024;179:108810. DOI: https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2024.108810
4. Рудометова Н.Б., Щербаков Д.Н., Рудометов А.П. и др. Модельные системы вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1), используемые для оценки эффективности кандидатных вакцин и лекарственных препаратов против ВИЧ-1 *in vitro*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(2): 214–21. Rudometova N.B., Shcherbakov D.N., Rudometov A.P., et al. Model systems of human immunodeficiency virus (HIV-1) for *in vitro* efficacy assessment of candidate vaccines and drugs against HIV-1. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(2):214–21. DOI: https://doi.org/10.18699/VJGB-22-26 EDN: https://elibrary.ru/clbskg
5. Welch S.R., Guerrero L.W., Chakrabarti A.K., et al. Lassa and Ebola virus inhibitors identified using minigenome and recombinant virus reporter systems. *Antiviral. Res*. 2016;136:9–18. DOI: https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.10.007
6. Chen M., Zhang X.E. Construction and applications of SARS-CoV-2 pseudoviruses: a mini review. *Int. J. Biol. Sci*. 2021;17(6):1574–80. DOI: https://doi.org/10.7150/ijbs.59184
7. Xiang Q., Li L., Wu J., et al. Application of pseudovirus system in the development of vaccine, antiviral-drugs, and neutralizing antibodies. *Microbiol. Res*. 2022;258:126993. DOI: https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.126993
8. Ory D.S., Neugeboren B.A., Mulligan R.C. A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996;93(21):11400–6. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.93.21.11400
9. Nie J., Wu X., Wang Y. Assays based on pseudotyped viruses. *Adv. Exp. Med. Biol*. 2023;1407:29–44. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-99-0113-5_2
10. Wang Y., ed. *Pseudotyped Viruses*. Springer Singapore;2023. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-99-0113-5
11. Montefiori D.C., Mascola J.R. Neutralizing antibodies against HIV-1: can we elicit them with vaccines and how much do we need? *Curr. Opin. HIV AIDS*. 2009;4(5):347–51. DOI: https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32832f4a4d
12. Li M., Gao F., Mascola J.R., et al. Human immunodeficiency virus type 1 env clones from acute and early subtype B infections for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies. *J. Virol*. 200;79(16):10108–25. DOI: https://doi.org/10.1128/JVI.79.16.10108-10125.2005
13. Li Q., Liu Q., Huang W., et al. Current status on the development of pseudoviruses for enveloped viruses. *Rev. Med. Virol*. 2018;28(1):e1963. DOI: https://doi.org/10.1002/rmv.1963
14. Platt E.J., Wehrly K., Kuhmann S.E., et al. Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol*. 1998;72(4):2855–64. DOI: https://doi.org/10.1128/JVI.72.4.2855-2864.1998
15. Wei X., Decker J.M., Liu H., et al. Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2002;46(6):1896–905. DOI: https://doi.org/10.1128/AAC.46.6.1896-1905.2002
16. Guo Y., Rumschlag-Booms E., Wang J., et al. Analysis of hemagglutinin-mediated entry tropism of H5N1 avian influenza. *Virol. J*. 2009;6:39. DOI: https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-39
17. Wang W., Nie J., Prochnow C., et al. A systematic study of the N-glycosylation sites of HIV-1 envelope protein on infectivity and antibody-mediated neutralization. *Retrovirology*. 2013;10:14. DOI: https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-14
18. Kretschmer M., Kadlubowska P., Hoffmann D., et al. Zikavirus prME envelope pseudotyped human immunodeficiency virus type-1 as a novel tool for glioblastoma-directed virotherapy. *Cancers (Basel)*. 2020;12(4):1000. DOI: https://doi.org/10.3390/cancers12041000
19. Wrin T., Loh T.P., Vennari J.C., et al. Adaptation to persistent growth in the H9 cell line renders a primary isolate of human immunodeficiency virus type 1 sensitive to neutralization by vaccine sera. *J. Virol*. 1995;69(1):39–48. DOI: https://doi.org/10.1128/JVI.69.1.39-48.1995
20. Phanuphak N., Gulick R.M. HIV treatment and prevention 2019: current standards of care. *Curr. Opin. HIV AIDS*. 2020;15(1):4–12. DOI: https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000588
21. Arts E.J., Hazuda D.J. HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harb. Perspect. Med*. 2012;2(4):a007161. DOI: https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007161
22. Lobritz M.A., Ratcliff A.N., Arts E.J. HIV-1 entry, inhibitors, and resistance. *Viruses*. 2010;2(5):1069–105. DOI: https://doi.org/10.3390/v2051069
23. Xiao T., Cai Y., Chen B. HIV-1 entry and membrane fusion inhibitors. *Viruses*. 2021;13(5):735. DOI: https://doi.org/10.3390/v13050735
24. Solomon M., Liang C. Pseudotyped viruses for retroviruses. *Adv. Exp. Med. Biol*. 2023;1407:61–84. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-99-0113-5_4
25. Westby M., van der Ryst E. CCR5 antagonists: host-targeted antivirals for the treatment of HIV infection. *Antivir. Chem. Chemother*. 2005;16(6):339–54. DOI: https://doi.org/10.1177/095632020501600601
26. Ding X., Zhang X., Chong H., et al. Enfuvirtide (T20)-based lipopeptide is a potent HIV-1 cell fusion inhibitor: implications for viral entry and inhibition. *J. Virol*. 2017;91(18):e00831–17. DOI: https://doi.org/10.1128/JVI.00831-17
27. Cocklin S., Gopi H., Querido B., et al. Broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus (HIV) potential of a peptide HIV type 1 entry inhibitor. *J. Virol*. 2007;81(7):3645–8. DOI: https://doi.org/10.1128/JVI.01778-06
28. London G.M., Mayosi B.M., Khati M. Isolation and characterization of 2'-F-RNA aptamers against whole HIV-1 subtype C envelope pseudovirus. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2015;456(1):428–33. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.11.101
29. Xu L., Zhang T., Xu X., et al. DNA triplex-based complexes display anti-HIV-1-Cell fusion activity. *Nucleic Acid Ther*. 2015;25(4):219–25. DOI: https://doi.org/10.1089/nat.2015.0535
30. Kanizsai S., Ongrádi J., Aradi J., Nagy K. New approach for inhibition of HIV entry: modifying CD4 binding sites by thiolated pyrimidine derivatives. *Pathol. Oncol. Res*. 2016;22(3):617–23. DOI: https://doi.org/10.1007/s12253-016-0044-y
31. Zhao Q., Ma L., Jiang S., et al. Identification of N-phenyl-N'-(2,2,6,6-tetramethyl-piperidin-4-yl)-oxalamides as a new class of HIV-1 entry inhibitors that prevent gp120 binding to CD4. *Virology*. 2005;339(2):213–25. DOI: https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.06.008
32. Curreli F., Belov D.S., Ramesh R.R., et al. Design, synthesis and evaluation of small molecule CD4-mimics as entry inhibitors

possessing broad spectrum anti-HIV-1 activity. *Bioorg. Med. Chem*. 2016;24(22):5988–6003.
DOI: https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.09.057

33. Fomenko V.V., Rudometova N.B., Yarovaya O.I., et al. Synthesis and in vitro study of antiviral activity of glycyrrhizin nicotinate derivatives against HIV-1 pseudoviruses and SARS-CoV-2 viruses. *Molecules*. 2022;27(1):295.
DOI: https://doi.org/10.3390/molecules27010295
34. Фандо А.А., Фоменко В.В., Рудомётова Н.Б. и др. Модификация методики синтеза глицивира и исследование антивирусной активности полученных в ходе синтеза препаратов в отношении ENV-псевдовирусов ВИЧ-1. *Химия растительного сырья*. 2023;(4):387–95. Fando A.A., Fomenko V.V., Rudometova N.B., et al. Synthesis of glycivir derivatives using modification of synthesis procedure studying their antiviral activity against ENV-pseudovirouses HIV-1. *Chemistry of Plant Raw Material*. 2023;(4):387–95.
DOI: https://doi.org/10.14258/jcprm.20230413841
EDN: https://elibrary.ru/uzjyqg
35. Wang C.R., Zhou R., Ng T.B., et al. First report on isolation of methyl gallate with antioxidant, anti-HIV-1 and HIV-1 enzyme inhibitory activities from a mushroom (*Pholiota adiposa*). *Environ. Toxicol. Pharmacol*. 2014;37(2):626–37.
DOI: https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.01.023
36. Mavhandu L.G., Cheng H., Bor Y.C., et al. Development of a pseudovirus assay and evaluation to screen natural products for inhibition of HIV-1 subtype C reverse transcriptase. *J. Ethnopharmacol*. 2020;258:112931.
DOI: https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112931
37. Liu Q., Kwan K.Y., Cao T., et al. Broad-spectrum antiviral activity of Spatholobus suberectus Dunn against SARS-CoV-2, SARS-CoV-1, H5N1, and other enveloped viruses. *Phytother. Res*. 2022;36(8):3232–47.
DOI: https://doi.org/10.1002/ptr.7452
38. Su X., Wang Q., Wen Y., et al. Protein- and peptide-based virus inactivators: inactivating viruses before their entry into cells. *Front. Microbiol*. 2020;11:1063.
DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01063
39. Parajuli B., Acharya K., Bach H.C., et al. Restricted HIV-1 Env glycan engagement by lectin-reengineered DAVEI protein chimera is sufficient for lytic inactivation of the virus. *Biochem. J*. 2018;475(5):931–57.
DOI: https://doi.org/10.1042/BCJ20170662
40. Беседнова Н.Н., Запорожец Т.С., Ермакова С.П., и др. Природные соединения – потенциальная основа средств профилактики и терапии гепатита С. *Антибиотики и химиотерапия*. 2023;68(11-12):75–90. Besednova N.N., Zaporozhets T.S., Ermakova S.P., et al. Natural compounds as potential basis for the prevention and treatment of hepatitis C. *Antibiotics and Chemotherapy*. 2023;68(11-12):75–90.
DOI: https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-11-12-75-90
EDN: https://elibrary.ru/besoof
41. Дерябин П.Г. Гепатит С: современное состояние и перспективы. *Вопросы вирусологии*. 2012;(S1):91–103. Deryabin P.G. Hepatitis C: current state and prospects. *Problems of Virology*. 2012;(S1):91–103. EDN: https://elibrary.ru/osnmkg
42. Chowdhury P., Sahuc M.E., Rouillé Y., et al. Theaflavins, polyphenols of black tea, inhibit entry of hepatitis C virus in cell culture. *PLoS One*. 2018;13(11):e0198226.
DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198226
43. Nafisi S., Roy S., Gish R., et al. Defining the possibilities: is short duration treatment of chronic hepatitis C genotype 1 with sofosbuvir-containing regimens likely to be as effective as current regimens? *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther*. 2016;14(1): 41–56. DOI: https://doi.org/10.1586/14787210.2016.1114883
44. Li B., Li L., Peng Z., et al. Harzianoic acids A and B, new natural scaffolds with inhibitory effects against hepatitis C virus. *Bioorg. Med. Chem*. 2019;27(3):560–7.
DOI: https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.12.038
45. Hung T.C., Jassey A., Liu C.H., et al. Berberine inhibits hepatitis C virus entry by targeting the viral E2 glycoprotein. *Phytomedicine*. 2019;53:62–9.
DOI: https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.09.025
46. Shahid M., Qadir A., Yang J., et al. An engineered microvirin variant with identical structural domains potently inhibits human immunodeficiency virus and hepatitis C virus cellular entry. *Viruses*. 2020;12(2):199.
DOI: https://doi.org/10.3390/v12020199
47. Zhang K.X., Qian X.J., Zheng W., et al. Synthesis and *in vitro* anti-HCV and antitumor evaluation of schisandronic acid derivatives. *Med. Chem*. 2021;17(9):974–82.
DOI: https://doi.org/10.2174/1573406416999200818150053
48. Zhang H., Zheng X., Li J., et al. Flavonoid-triazolyl hybrids as potential anti-hepatitis C virus agents: synthesis and biological evaluation. *Eur. J. Med. Chem*. 2021;218:113395.
DOI: https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113395
49. Bartosch B., Dubuisson J., Cosset F.L. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J. Exp. Med*. 2003;197(5):633–42.
DOI: https://doi.org/10.1084/jem.20021756
50. Kambara H., Tani H., Mori Y., et al. Involvement of cyclophilin B in the replication of Japanese encephalitis virus. *Virology*. 2011; 412(1):211–9. DOI: https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.01.011
51. Liu H., Wu R., Yuan L., et al. Introducing a cleavable signal peptide enhances the packaging efficiency of lentiviral vectors pseudotyped with Japanese encephalitis virus envelope proteins. *Virus Res*. 2017;229:9–16.
DOI: https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.12.007
52. Hu H.P., Hsieh S.C., King C.C., Wang W.K. Characterization of retrovirus-based reporter viruses pseudotyped with the precursor membrane and envelope glycoproteins of four serotypes of dengue viruses. *Virology*. 2007;368(2):376–87.
DOI: https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.06.026
53. Pan T., Peng Z., Tan L., et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs potently inhibit the replication of Zika viruses by inducing the degradation of AXL. *J. Virol*. 2018;92(20):e01018–18.
DOI: https://doi.org/10.1128/JVI.01018-18
54. Zhang L., Wang X., Ming A., Tan W. Pseudotyped virus for Flaviviridae. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2023;1407:313–27.
DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-99-0113-5_17
55. Del Rosario J.M.M., da Costa K.A.S., Temperton N.J. Pseudotyped viruses for influenza. *Adv. Exp. Med. Biol*. 2023;1407:153–73.
DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-99-0113-5_8
56. Huang S.W., Tai C.H., Hsu Y.M., et al. Assessing the application of a pseudovirus system for emerging SARS-CoV-2 and re-emerging avian influenza virus H5 subtypes in vaccine development. *Biomed. J*. 2020;43(4):375–87.
DOI: https://doi.org/10.1016/j.bj.2020.06.003
57. Carnell G.W., Ferrara F., Grehan K., et al. Pseudotype-based neutralization assays for influenza: a systematic analysis. *Front. Immunol*. 2015;6:161.
DOI: https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00161
58. Antanasijevic A., Cheng H, Wardrop D.J., et al. Inhibition of influenza H7 hemagglutinin-mediated entry. *PLoS One*. 2013;8(10):e76363.
DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076363
59. Wu W., Wang J., Lin D., et al. Super short membrane-active lipopeptides inhibiting the entry of influenza A virus. *Biochim. Biophys. Acta*. 2015a;1848(10 Pt. A):2344–50.
DOI: https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.06.015
60. Wu W., Li R., Li X., et al. Quercetin as an antiviral agent inhibits influenza A virus (IAV) entry. *Viruses*. 2015;8(1):6.
DOI: https://doi.org/10.3390/v8010006
61. Zhu Z., Yao Z., Shen X., et al. Oligothiophene compounds inhibit the membrane fusion between H5N1 avian influenza virus and the endosome of host cell. *Eur. J. Med. Chem*. 2017;130:185–94. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.02

62. Zeng L.Y., Liu T., Yang J., et al. "On-water" facile synthesis of novel Pyrazolo[3,4-b]pyridinones possessing anti-influenza virus activity. *ACS Comb. Sci*. 2017;19(7):437–46. DOI: https://doi.org/10.1021/acscombsci.7b00016
63. Liao Y., Chen L., Li S., et al. Structure-aided optimization of 3-O-β-chacotriosyl ursolic acid as novel H5N1 entry inhibitors with high selective index. *Bioorg. Med. Chem*. 2019;27(18):4048–58. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.07.028
64. Cao N., Cai Y., Huang X., et al. Inhibition of influenza A virus and SARS-CoV-2 infection or co-infection by griffithsin and griffithsin-based bivalent entry inhibitor. *mBio*. 2024;15(5):e0074124. DOI: https://doi.org/10.1128/mbio.00741-24
65. Tan C., Wang N., Deng S., et al. The development and application of pseudoviruses: assessment of SARS-CoV-2 pseudoviruses. *PeerJ*. 2023;11:e16234. DOI: https://doi.org/10.7717/peerj.16234
66. Trischitta P., Tamburello M.P., Venuti A., et al. Pseudovirus-based systems for screening natural antiviral agents: a comprehensive review. *Int. J. Mol. Sci*. 2024;25(10):5188. DOI: https://doi.org/10.3390/ijms25105188
67. Kononova A.A., Sokolova A.S., Cheresiz S.V., et al. N-heterocyclic borneol derivatives as inhibitors of Marburg virus glycoprotein-mediated VSIV pseudotype entry. *Medchemcomm*. 2017;8(12):2233–7. DOI: https://doi.org/10.1039/c7md00424a
68. Liu Q., Fan C., Li Q., et al. Antibody-dependent-cellular-cytotoxicity-inducing antibodies significantly affect the post-exposure treatment of Ebola virus infection. *Sci. Rep*. 2017;7:45552. DOI: https://doi.org/10.1038/srep45552

Информация об авторах

Карпенко Лариса Ивановна✉ — д-р биол. наук, зав. лаб. рекомбинантных вакцин, в. н. с. отдела биоинженерии ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, lkarpenko1@ya.ru, https://orcid.org/0000-0003-4365-8809

Рудометова Надежда Борисовна — канд. биол. наук, с. н. с. отдела биоинженерии ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, nadenkaand100@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-1684-9071

Низоленко Лилия Филипповна — канд. биол. наук, с. н. с. отдела биоинженерии ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, nizolenko@inbox.ru, https://orcid.org/0000-0002-9647-4969

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: *Карпенко Л.И.* — идея и дизайн исследования; написание и редактирование рукописи; *Рудометова Н.Б.* — написание, редактирование рукописи, создание и оформление рисунков; *Низоленко Л.Ф.* — сбор и обработка материала; написание и редактирование рукописи; *Локтев В.Б.* — концептуализация исследования; 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 09.04.2025;
принята к публикации 18.06.2025;
опубликована 28.08.2025

Information about the authors

Larisa I. Karpenko✉ — D. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of recombinant vaccines, leading researcher, Bioengineering department, State Scientific Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Russia, lkarpenko1@ya.ru, https://orcid.org/0000-0003-4365-8809

Nadezhda B. Rudometova — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Bioengineering department, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Russia, nadenkaand100@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-1684-9071

Lily F. Nizolenko — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Bioengineering department, State Scientific Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Russia, nizolenko@inbox.ru, https://orcid.org/0000-0002-9647-4969

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: *Karpenko L.I.* — idea and design of the research; writing and editing the manuscript; *Rudometova N.B.* — writing and editing the manuscript; illustration creation and design; *Nizolenko L.F.* — collection and processing of material; writing and editing the manuscript; *Loktev V.B.* — conceptualization of the study, 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 09.04.2025;
accepted for publication 18.06.2025;
published 28.08.2025

Научный обзор
https://doi.org/10.36233/0372-9311-696

Биоконъюгация как перспективный метод создания вакцин

Цыганова М.И.[1]✉, Новиков Д.В.[1], Новиков В.В.[1], Караулов А.В.[2]

[1]Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия;
[2]Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Аннотация

Введение. Биоконъюгация, или технология рекомбинантного бактериального гликозилирования (protein glycan coupling technology, PGCT), — это метод создания углеводно-белковых композитов, основанный на способности некоторых бактерий осуществлять гликозилирование по типу эукариот и позволяющий получать гликопротеины непосредственно в клетках бактерий-продуцентов, чаще всего *Escherichia coli*, минуя стадию химической конъюгации. Это значительно упрощает создание и производство конъюгированных вакцин, состоящих из полисахаридных антигенов, объединённых с белковым носителем, выполняющим функции Т-клеточного антигена и адъюванта.

Цель обзора: проанализировать и обобщить актуальные данные как о самом методе биоконъюгации, так и о биохимических процессах, лежащих в его основе, а также о разрабатываемых с его использованием вакцинах.

При подготовке обзора были рассмотрены работы, представленные в базах PubMed, Scopus, Google Scholar, eLIBRARY.RU по состоянию на февраль 2025 г. Для поиска использовали следующие ключевые слова: bioconjugation, vaccines, PGCT, биоконъюгация, конъюгированные вакцины, бактериальное гликозилирование.

Проведён анализ источников литературы, посвящённых изучению бактериального N-гликозилирования, на базе которого была создана технология биоконъюгации, а также сходных с ним процессов, протекающих в отдельных видах бактерий. Проанализированы сообщения о разработке новых и усовершенствовании уже имеющихся вакцин против наиболее актуальных патогенов. В настоящий момент вакцинация представляется наиболее эффективным способом борьбы с инфекционными заболеваниями, включая также противодействие распространению антибиотикорезистентных микроорганизмов. Разнообразие патогенов, с которыми сталкивается человечество, вынуждает искать множественные подходы для создания эффективных и безопасных вакцин. Упрощение и снижение себестоимости производства новых препаратов даёт возможность более уверенно противостоять угрозе новых эпидемий. Биоконъюгация помогает создавать новые вакцины и совершенствовать уже имеющиеся, хотя и обладает определёнными ограничениями.

Заключение. Современное производство вакцин характеризуется разнообразием подходов, объединённых одной целью — эффективно противостоять угрозам новых эпидемий. Биоконъюгация — один из новых, но довольно многообещающих методов, с помощью которого уже разрабатывается несколько вакцин-кандидатов. Анализ текущего состояния этих проектов может быть полезен при выборе подхода для создания последующих профилактических иммунопрепаратов.

Ключевые слова: *обзор, вакцины, бактериальное гликозилирование, биоконъюгация, рекомбинантные белки*

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: Цыганова М.И., Новиков Д.В., Новиков В.В., Караулов А.В. Биоконъюгация как перспективный метод создания вакцин. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2025;102(4):495–506.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-696
EDN: https://www.elibrary.ru/UYTHOH

© Цыганова М.И., Новиков Д.В., Новиков В.В., Караулов А.В., 2025

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-696

Review
https://doi.org/10.36233/0372-9311-696

Bioconjugation as a promising method for vaccine development

Maria I. Tsyganova[1]✉, Dmitry V. Novikov[1], Viktor V. Novikov[1], Alexander V. Karaulov[2]

[1]Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia;
[2]I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Abstract
Introduction. Bioconjugation, or protein glycan coupling technology, PGCT, is a method for creating carbohydrate-protein composites based on the ability of certain bacteria to perform eukaryotic-type glycosylation. This method allows for the production of glycoproteins directly in the cells of producer bacteria, most often *Escherichia coli*, bypassing the stage of chemical conjugation. This significantly simplifies the creation and production of conjugated vaccines, consisting of polysaccharide antigens combined with a protein carrier that performs the functions of a T-cell antigen and an adjuvant.
The aim of the review is to analyze and summarize current data on both the bioconjugation method itself and the underlying biochemical processes, as well as on the vaccines being developed using this method.
The preparation of the review involved studies presented in the PubMed, Scopus, Google Scholar, eLIBRARY.RU databases as of February 2025. The following keywords were used for the search: bioconjugation, vaccines, PGCT, conjugated vaccines, bacterial glycosylation.
An analysis of literature sources dedicated to the study of bacterial N-glycosylation, on the basis of which the bioconjugation technology was developed, as well as similar processes occurring in certain bacterial species, was conducted. Reports on the development of new vaccines and the improvement of existing vaccines against the most relevant pathogens have been analyzed. At present, vaccination appears to be the most effective way to combat infectious diseases, including efforts to counter the spread of antibiotic-resistant microorganisms. The diversity of pathogens encountered by the human population compels the search for multiple approaches of creating effective and safe vaccines. Simplifying and reducing the cost of producing new drugs allows for a more confident response to the threat of new epidemics. Bioconjugation helps create new vaccines and improve existing vaccines, although there are certain limitations.
Conclusion. Modern vaccine production is characterized by a variety of approaches united by a single goal — to effectively counter the threats of new epidemics. Bioconjugation is one of the new, yet quite promising methods through which several vaccine candidates are already being developed. The analysis of the current state of these projects may be useful in choosing an approach for developing subsequent preventive immunological drugs.

Keywords: *review, vaccines, bacterial glycosylation, bioconjugation, recombinant proteins*

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: Tsyganova M.I., Novikov D.V., Novikov V.V., Karaulov A.V. Bioconjugation as a promising method for vaccine development. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2025;102(4):495–506.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-696
EDN: https://www.elibrary.ru/UYTHOH

Введение

В ноябре 2024 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) уточнила список приоритетных эндемичных патогенов, в вакцинах против которых существует наибольшая необходимость [1], отметив при этом, что вакцинация позволяет не только сократить заболеваемость, но и уменьшить употребление антибиотиков, тем самым снижая смертность, вызванную антибиотикорезистентными штаммами. Согласно расчётам ВОЗ, вакцинация против 23 патогенов может снизить потребность в антибиотиках на 22% [2]. Более того, масштабное применение уже существующих вакцин против пневмококка, гемофильной палочки типа b и брюшного тифа потенциально позволит каждый год предотвращать до 106 тыс. смертей, обусловленных распространением устойчивости к противомикробным препаратам. Разработка и глобальное внедрение новых вакцин против *Mycobacterium tuberculosis* и *Klebsiella pneumoniae* в перспективе позволят ежегодно предотвращать более 500 тыс. случаев смертей, вызванных устойчивостью к противомикробным препаратам. Для изготовления наиболее эффективных вакцин в настоящий момент используются самые разные подходы. Одним из них является биоконъюгация, или технология рекомби-

© Tsyganova M.I., Novikov D.V., Novikov V.V., Karaulov A.V., 2025

нантного бактериального гликозилирования (protein glycan coupling technology, PGCT).

Цель данного обзора — анализ и обобщение актуальных данных как о самом методе биоконъюгации, так и о биохимических процессах, лежащих в его основе, а также о разрабатываемых с его использованием вакцинах.

При подготовке обзора был проведён анализ как англо-, так и русскоязычной литературы, представленной в научных базах PubMed, Scopus, Google Scholar, eLIBRARY.RU по состоянию на февраль 2025 г. Для поиска использовали следующие ключевые слова: bioconjugation, vaccines, PGCT, биоконъюгация, конъюгированные вакцины, бактериальное гликозилирование. На первом этапе при запросе «bioconjugation» за 1968–2025 гг. было обнаружено более 6000 источников, число которых путём комбинирования запросов было уменьшено до 250. Из них сначала были отобраны работы 2010–2025 гг., что сократило количество до 178, вслед за чем был добавлен ряд релевантных статей без временны́х ограничений для максимально полного освещения исследуемой проблемы. В связи с ограничением по объёму статьи отобрано 59 наиболее релевантных источника. Также из подборки были исключены работы, для которых невозможно было получить полный текст статьи, источники не на английском языке, а также те русскоязычные статьи, в которых затронутая проблема упоминалась, но не освещалась подробно, ограничиваясь ссылками на уже использованные в обзоре иностранные источники.

Ключевые особенности биоконъюгации

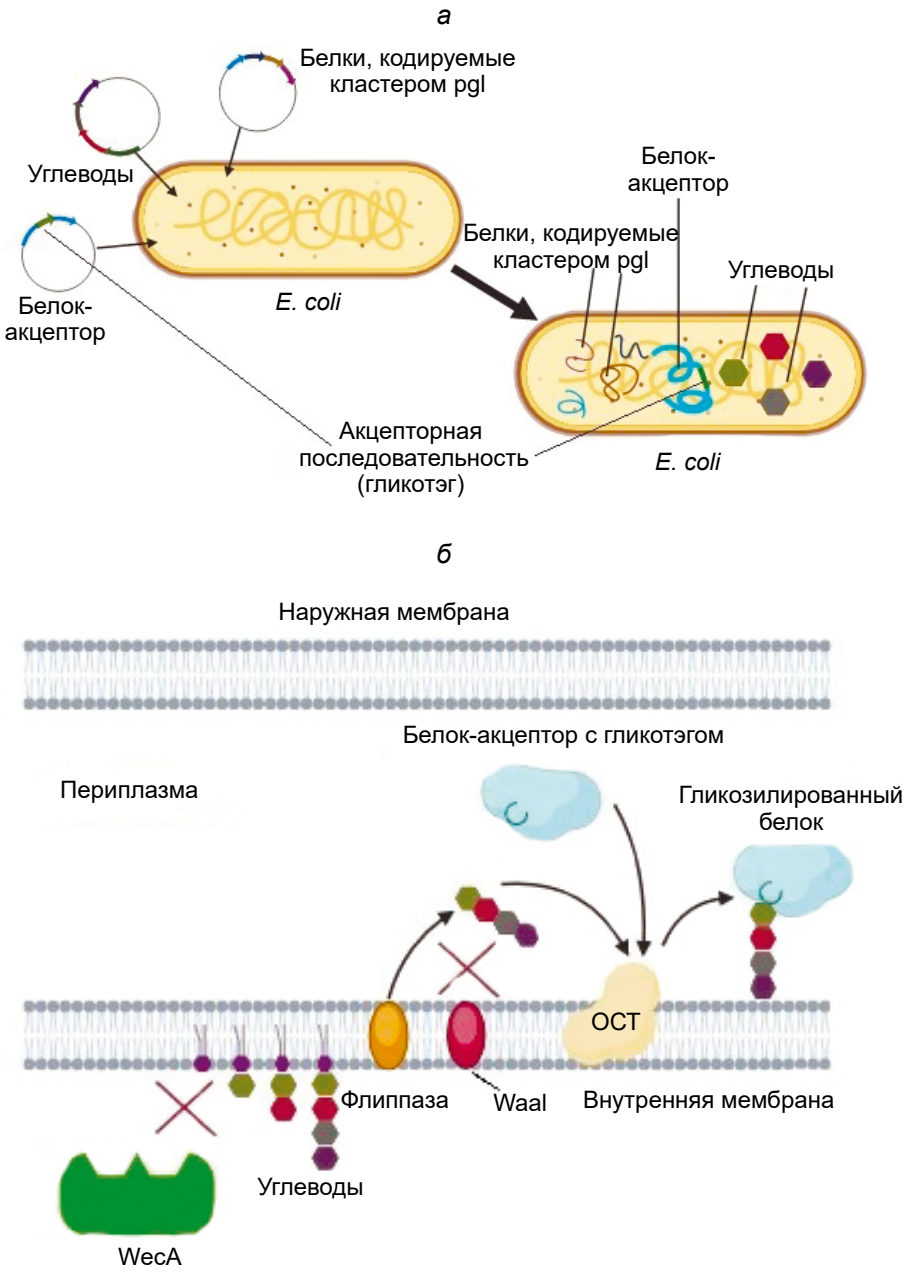
PGCT была создана на основе описанной в 1999 г. [3] способности микроорганизма *Campylobacter jejuni* осуществлять N-гликозилирование белков с помощью олигосахарилтрансферазы (ОСТ) PglB, экспрессируемой наряду с другими ферментами кластером, получившим название pgl (protein glycosylation). PglB является мембранным ферментом с активным центром, обращённым в периплазматическое пространство. Он способен присоединять олигосахарид, состоящий в основном из мономеров N-ацетилгалактозамина (GalNac), к остатку аспарагина, расположенному в центре так называемой акцепторной последовательности [4]. Акцепторная последовательность PglB следующая: Asp/Glu — Y — Asn — X — Ser/Tre, где X и Y — любые аминокислоты, кроме пролина [5]. Присоединение олигосахарида идёт через амидную группу аспарагина и относится к N-гликозилированию. Кластер pgl успешно клонирован в *Escherichia coli* и продемонстрировал способность экспрессировать весь набор необходимых для гликозилирования ферментов, а также — при наличии белков с необходимой акцепторной последовательностью — осуществлять собственно гликозилирование [6]. Таким образом, появилась возможность получать гликозилированные белки непосредственно в *E. coli*. Этот процесс получил название биоконъюгации, или технологии PGCT (**рисунок**).

Исторически в производстве вакцин на базе полисахаридных антигенов используются углеводы, химическим способом ковалентно присоединенные к белку-носителю, выполняющему функции Т-клеточного антигена и частично адъюванта. Открытие бактериального N-гликозилирования и возможности его функционального переноса в *E. coli* позволило начать разработку препаратов, в которых и получение антигенов, и их конъюгация происходит непосредственно в организме-продуценте, что упрощает и удешевляет процесс.

Первые попытки создать вакцину с помощью технологий PGCT появились в 2010 г. [7]. J. Ihssen и соавт. опубликовали сообщение об успешном получении в *E. coli* конъюгатов, состоящих из О-антигена *Shigella dysenteriae* серотип 1 и белков AcrA *C. jejuni* и экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) соответственно. После этого сообщения о разработке новых вакцин против самых разных патогенов на базе PGCT стали поступать регулярно. Однако сразу возникли трудности, связанные прежде всего с тем, что PglB способен переносить только олигосахариды с редуцирующим концевым остатком, катализируя образование связи по ацетамидной группе во 2-м положении, что резко ограничивает количество углеводных антигенов, которые можно использовать. Чтобы преодолеть эти ограничения, исследователи стали применять О-гликозилирующие бактериальные ОСТ, которые были обнаружены в таких видах как *P. aeruginosa*, *Neisseria meningitides*, *Francisella tularensis*, *Acinetobacter baylyi*.

В случае *P. aeruginosa* функции ОСТ выполняет фермент PilO, который переносит гликаны на белок PilA (пилин IV типа) [8]. *N. meningitides* экспрессирует белок PglL, кодируемый геном *pglL*, также гликозилирующий пилины [9]. *F. tularensis* содержит фермент PglA, осуществляющий присоединение пентасахаридов к белку PilA [10]. Фермент PglS из *A. baylyi* — О-гликозилтрансфераза, переносящая углеводные остатки на пилиноподобный белок ComP [11]. Все перечисленные белки при клонировании в *E. coli* продемонстрировали способность гликозилировать свои нативные субстраты [12]. При этом PilO переносил только короткие олигосахариды, тогда как PglL осуществлял гликозилирование длинными олигосахаридами, а кроме того, взаимодействовал с такими гликанами, которые для PglB недоступны, например, с O4 О-антигеном *Salmonella typhimurium*. Относительно PglS было выяснено, что он способен переносить олигосахариды с глюкозой в качестве редуцирующего концевого сахара, что выгодно выделяет его среди других бактериальных ОСТ [13]. Используя

DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-696



Общая схема PGCT в клетках *E. coli* ([18], с изменениями).

а — этап трансформации бактерий плазмидами, содержащими нуклеотидные последовательности, кодирующие, соответственно, белок-носитель с акцепторной последовательностью, специфичной для используемой OCT, набор углеводов, необходимых для его гликозилирования, а также кластер, содержащий необходимые для гликозилирования ферменты; *б* — процесс собственно гликозилирования, протекающий на внутренней мембране модифицированных для более эффективного синтеза биоконъюгатов клеток *E. coli*.

WaaL — О-антиген лигаза *E. coli*, конкурирующая с рекомбинантной OCT за олигосахара; WecA — фермент, катализирующий биосинтез нативных гликанов бактерии-продуцента; флиппаза — фермент, переносящий углеводную последовательность в периплазматическое пространство.

эти ферменты, исследователи смогли разработать и получить биоконъюгаты, способные вызывать иммунные реакции как у лабораторных животных, так и у людей. В настоящий момент в разной степени готовности находятся потенциальные биоконъюгатные вакцины против шигелл, патогенной *E. coli*, клебсиелл, пневмококка, бруцелл, золотистого стафилококка и других патогенов, составляющих наибольшую угрозу здравоохранению [2].

Биоконъюгированные вакцины против *Shigella*

Шигеллёз, или бактериальная дизентерия, вызывается микробами рода *Shigella*. Это грамотрицательные бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, которые проникают в желудочно-кишечный тракт, инфицируют слизистую оболочку толстой кишки и вызывают воспаление. Шигеллёз является одной из основных причин смертей от диареи во всём ми-

ре. Больше всего страдают дети в возрасте до 5 лет в странах с низким и средним уровнем дохода [14]. В настоящий момент известно четыре вида шигелл: *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. dysenteriae* и *S. boydii*. Наибольшую угрозу представляет вид *S. flexneri*. Известны 15 серотипов *S. flexneri*, наиболее распространённым из которых является *S. flexneri* 2a, за которым следуют *S. flexneri* 3a и *S. flexneri* 6. *S. sonnei* — доминирующий вид шигелл в промышленно развитых странах, для него известен один серотип. Несмотря на большое количество разработок, вышедших на стадию клинических испытаний [15] (**таблица**), лицензированной международной вакцины против шигеллёза пока не существует.

Первой биоконъюгированной вакциной, протестированной на людях, была кандидатная вакцина против *S. dysenteriae* [16]. При её создании полисахарид О-антигена *S. dysenteriae* типа O1 был биоконъюгирован в *E. coli* с рекомбинантной версией EPA и кластером PglB, получил название GVXN SD133 и прошел фазу I клинических испытаний [17]. Результаты показали, что вне зависимости от способа введения препарат хорошо переносился и обладал приемлемым уровнем безопасности. В крови вакцинированных было выявлено статистически значимое повышение уровня антител классов IgG и IgA против полисахарида O1 [16].

Затем была создана другая моновалентная вакцина против шигелл на основе О-антигена *S. flexneri* 2a, разработанная также на базе PglB. В качестве белкового носителя был выбран тот же rEPA. Биоконъюгат получил название Flexyn 2a. Были подтверждены безопасность и иммуногенность этого прототипа вакцины. Аналогично результатам, полученным в ходе исследования вакци-

Биоконъюгированные вакцины против различных патогенов, разрабатываемые в настоящее время

Патоген	Название препарата/характеристика биоконъюгата	Этап	Источник
Shigella spp.	GVXN SD133	Фаза I клинических испытаний	[17]
	Flexyn 2a	Фаза 2b клинических испытаний	[19]
	S4V	Фаза 1/2 клинических испытаний	NCT04056117 — ClinicalTrials.gov
Патогенная *E. coli* (*E. coli* O157)	Конъюгат О-антигена и MBP *E. coli* O157, OCT — PglB	Доклинические испытания на мышах	[23]
	Конъюгат О-антигена и белка CmeA *Citrobacter sedlakii* NRC6070, OCT — PglB	Лабораторные испытания	[25]
Внекишечная патогенная *E. coli*	ExPEC9V	Фаза III клинических испытаний	NCT04899336 — ClinicalTrials.gov
	ExPEC10V	I и II фазы клинических испытаний	NCT04306302, NCT03819049 — ClinicalTrials.gov
	Конъюгат O25B-антиген ExPEC и EPA, OCT — PglB	Лабораторные испытания	[32]
K. pneumoniae гипервирулентного типа (hvKp)	Конъюгат капсульных полисахаридов серотипов K1 и K2 с белком EPA-ComP, OCT — PglS	Доклинические испытания на мышах	[34]
K. pneumoniae	Конъюгат О-антигенов липополисахарида и белка EPA, OCT — PglS	Доклинические испытания на мышах	[36]
K. pneumoniae O1	KPO1-VLP	Доклинические испытания на мышах	[37]
S. pneumonia	Конъюгат капсульного полисахарида серотипа 4 и белка AcrA, OCT — PglB	Доклинические испытания на мышах	[39]
	Конъюгаты капсульного полисахарида ST4 и белков NanA, Sp-148, PiuA, OCT PglB	Доклинические испытания на мышах	[43]
	CPS8-EPA^{iGTcc}	Доклинические испытания на мышах	[44]
S. agalactiae	Конъюгат полисахаридов серотипов Ia, Ib и III с белком EPA-ComP, OCT — PglS	Доклинические испытания на мышах	[47]
B. abortus	Конъюгат О-полисахаридов *Yersinia enterocolitica* и холерного токсина B, OCT — PglL	Доклинические испытания на мышах	[52]
	Конъюгат О-полисахаридов *Brucella* и наночастиц Nano-B5, OCT — PglL	Доклинические испытания на мышах	[54]
S. aureus	CP5-EPA, CP8-EPA и CP5-Hla	Доклинические испытания на мышах	[56]
F. tularensis	Конъюгат О-антигена *F. tularensis* и EPA	Доклинические испытания на мышах	[58]
	Конъюгат О-антигена *F. tularensis* и белка CmeA *Citrobacter sedlakii* NRC6070, OCT — PglB	Лабораторные испытания	[25]

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-696

ны против *S. dysenteriae*, иммунизация препаратом Flexyn 2a выявила значительное повышение титров антител классов IgG и IgA против липополисахарида *S. flexneri* 2a [18]. Рандомизированное двойное слепое и плацебо-контролируемое исследование фазы 2b [19] показало достаточный уровень безопасности и иммуногенности вакцины. Эффективность биоконъюгата Flexyn 2a была дополнительно подтверждена и другими методами, включая оценку степени тяжести протекания шигеллёза. Было показано, что у вакцинированных этот показатель был ниже, чем у пациентов, получавших плацебо [20].

Многообещающие результаты, продемонстрированные при создании и испытании Flexyn 2a, способствовали разработке поливалентной вакцины. S4V — это четырёхвалентная биоконъюгированная вакцина, которая содержит О-антигены *S. flexneri* серотипов 2a, 3a, 6, а также *S. sonnei*, соединённые с белком-носителем EPA. В настоящее время в Кении проводится двойное слепое исследование S4V по подбору дозы и возрастной категории (взрослые, дети, младенцы). Данные, собранные в ходе этого исследования, станут важным шагом в разработке вакцины против шигелл [21].

Биоконъюгированные вакцины против патогенных штаммов *Escherichia coli*

Патогенные штаммы *E. coli* делятся на две группы: внекишечная патогенная *E. coli* (ExPEC) и кишечная патогенная *E. coli* (InPEC). Штаммы ExPEC в основном связаны с неонатальным менингитом и инфекциями мочевыводящих путей у взрослых (ИМП). Штаммы InPEC вызывают различные диарейные заболевания и подразделяются на 6 патотипов, в том числе энтерогеморрагические штаммы *E. coli*. Одним из наиболее распространённых представителей штаммов группы EHEC является энтерогеморрагическая кишечная палочка O157:H7 (*E. coli* O157), она вызывает диарею, геморрагический колит и гемолитико-уремический синдром [22]. Потребность в вакцинах для профилактики *E. coli* O157 очень высока. Работы по их созданию ведутся уже довольно давно, ряд препаратов проходит доклинические и клинические испытания, в том числе биоконъюгированная вакцина [23]. В качестве белка-носителя авторы выбрали мальтозосвязывающий белок, поскольку недавние исследования показали, что он является агонистом TLR4 и индуцирует активацию сигнального пути NF-κB, а также секрецию ряда провоспалительных цитокинов [24]. Конъюгацию осуществляли, используя PglB, к белку присоединяли О-антиген *E. coli* O157, организмом-продуцентом выступал штамм *E. coli* W3110. Полученный в результате биоконъюгат вызывал активацию как гуморального, так и клеточного звена иммунитета [23].

Ещё один прототип биоконъюгированной вакцины против *E. coli* O157 был создан с использованием экспериментальной технологии MAGIC (Mobile-element Assisted Glycoconjugation by Insertion on Chromosome) [25]. Суть метода заключается в использовании мобильных генетических элементов, в частности транспозона tn5, для интеграции сконструированных генетических последовательностей в хромосому *E. coli*. Разработчики MAGIC утверждают, что такая конструкция в значительной степени облегчает метаболическую нагрузку и способствует прямому увеличению биомассы продуцента и выхода биоконъюгата. Чтобы добиться такого результата, они использовали транспозон tn5, в нуклеотидную последовательность которого встроены участки, кодирующие PglB, белок-носитель *C. jejuni* AcrA и ферменты, участвующие в биосинтезе полисахаридов [26]. Биоконъюгированный прототип MAGIC-вакцины был получен в непатогенной бактерии *Citrobacter sedlakii* NRC6070. Белок-носитель, использованный для создания препарата, — CmeA 6xHis, полисахаридный компонент — О-антиген *C. sedlakii*, аналогичный таковому у *E. coli* O157, в качестве ОСТ использовался PglB. По своим биохимическим показателям биоконъюгат соответствовал заявленным требованиям. К сожалению, пока нет данных о каких-либо клинических испытаниях полученного препарата.

Внекишечные штаммы патогенной *E. coli* (ExPEC) также довольно опасны, т. к. способны вызывать заболевания разного характера. Штаммы ExPEC относят к 3 основным патотипам: уропатогенная *E. coli* (UPEC), вызывающая сепсис *E. coli* (SEPEC), и *E. coli*, ассоциированная с неонатальным менингитом [27]. К сожалению, ИМП, вызванные ExPEC, крайне тяжело поддаются излечению. Создание эффективных вакцин, предотвращающих подобное развитие событий, является крайне важной задачей. Для её решения, наряду с другими подходами, применены и методы PGCT. Работы начались с создания 4-валентного прототипа, в состав которого входили 4 конъюгированные с EPA варианта О-антигена. Продемонстрирована хорошая переносимость прототипа и достоверное повышение уровня антител класса IgG против всех антигенов, снижение количества зарегистрированных случаев ИМП среди участников испытаний [28, 29]. На основе 4-валентного прототипа создана 9-валентная вакцина ExPEC9V, содержащая конъюгированный полисахарид и проходящая в настоящее время клинические испытания III фазы (NCT04899336).

Продолжается изучение безопасности и иммуногенности 10-валентного препарата ExPEC10V среди пожилых людей в возрасте 60–85 лет (I и II фазы, NCT04306302, NCT03819049). Как и четырёхвалентный прототип, этот препарат хорошо пе-

реносится и индуцирует выработку антигенспецифических антител у большинства участников, несмотря на их преклонный возраст [30].

Схожий подход был применён при создании прототипа вакцины на базе O25B антигена ExPEC. Хотя О-антиген *E. coli* насчитывает более 180 серотипов, среди изолятов, полученных от носителей ИМП, значительное число относится к серотипу O25B [31]. Поэтому группой исследователей была предпринята попытка создать вакцину на базе именно этого антигена. Кластер О-антигена был встроен в геном *E. coli* W3110, после чего экспрессированный полисахарид был ферментативно конъюгирован с EPA ферментом PglB. Детальная характеристика конъюгата O25B-EPA с использованием физико-химических методов, включая ядерно-магнитный резонанс и газовую хроматографию — масс-спектрометрию, подтвердила соответствие структуре O25B, открывая тем самым возможность разработки поливалентной конъюгированной вакцины против ExPEC [32].

Биоконъюгированные вакцины против *Klebsiella pneumoniae*

Грам-отрицательная бактерия *K. pneumoniae* является вторым по распространённости условно-патогенным микроорганизмом после *E. coli*. Она вызывает неонатальный сепсис, ИМП и внутрибольничные пневмонии, плохо поддающиеся лечению из-за устойчивости к противомикробным препаратам — бактерии приобретают такие факторы устойчивости, как β-лактамазы расширенного спектра действия и карбапенемазы *K. pneumoniae*. ВОЗ присвоила самые высокие уровни опасности изолятам, содержащим эти факторы [33], что подтверждает острую необходимость в создании эффективной и безопасной вакцины.

С использованием технологии PGCT разрабатывается несколько вакцинных препаратов. M.F. Feldman и соавт. сосредоточились на создании вакцины против *K. pneumoniae* гипервирулентного типа (hvKp), поскольку именно эта разновидность патогена является наиболее опасной. Если другие серотипы, как правило, вызывают заболевания у пациентов, находящихся в стационарах, пожилых людей, младенцев или людей с иммунодефицитами различной природы, то hvKp представляют угрозу и для здоровых людей [34]. Механизмы гипервирулентности до конца не выяснены, но предполагается, что основной причиной является избыток капсульного полисахарида, затрудняющий выведение патогена из организма. В качестве основной ОСТ исследователи выбрали PglS из *A. baylyi*, в качестве белка-носителя — EPA, слитый с белком ComP. В качестве углеводного компонента были использованы капсульные полисахариды наиболее распространённых серотипов K1 и K2, кластеры синтеза которых клонировали в клетки-продуценты *E. coli* с частично заблокированными естественными гликозилтрансферазами. Полученные гликопротеины при введении мышам показали способность к индукции синтеза протективных антител класса IgG1, значительно повышающих выживаемость мышей при последующем заражении.

Ещё одна вакцина разрабатывается против классических серотипов *K. pneumonia*. В качестве углеводного компонента используются О-антигены бактериального липополисахарида. В отличие от капсульных полисахаридов, в настоящий момент известно всего 11 серотипов О-антигенов, экспрессируемых *K. pneumoniae* [35]. На основе 7 наиболее часто встречающихся серотипов О-антигенов была сконструирована гептавалентная биоконъюгатная вакцина. В качестве ОСТ был выбран фермент PglS, белок-носитель — рекомбинантный EPA со вставкой акцепторной последовательности для PglS. В качестве продуцента использовали штамм *E. coli* CLM24. После выделения и очистки гликопротеины всех 7 типов были использованы для иммунизации мышей, что сопровождалось выработкой высокого уровня антител класса IgG ко всем гликопротеинам. Однако бактерицидность антител против различных штаммов *K. pneumoniae* оказалась невысокой, что свидетельствует о необходимости доработки вакцины. В связи с этим авторы предлагают ввести в состав вакцины капсульные антигены [36].

Ещё одна вакцина против *K. pneumoniae* с использованием PGCT разрабатывается на базе PglL. В качестве белка-акцептора использован универсальный рекомбинантный белок SpyCather4573 и специально модифицированный штамм *E. coli*, в геном которого интегрированы оба ключевых компонента: SC4573 и PglL. Гликопротеины, полученные таким образом, могут спонтанно связываться с белковыми наноносителями *in vitro* с помощью системы SpyTag с образованием конъюгированных нановакцин. Для повышения эффективности экспрессии гликопротеинов был удалён кластер генов *yfdGHI*. Полученная конъюгированная нановакцина против *K. pneumoniae* O1 (KPO1-VLP) продемонстрировала свою эффективность в экспериментах, где после трёхкратной иммунизации наблюдались высокие титры антител и 100-процентная защита от заражения вирулентным штаммом [37].

Биоконъюгированные вакцины против *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae, пневмококк, — один из самых распространенных и вредоносных возбудителей бактериальных пневмоний, менингитов и сепсиса. Несмотря на наличие вакцин, *S. pneumoniae* по-прежнему является причиной более 1 млн смертей в год, главным образом среди детей в возрасте до 5 лет из стран с низким и средним уровнем

DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-696

дохода [38]. Поскольку большая часть капсульных полисахаридов *S. pneumoniae* содержат в качестве концевого остатка сахар, который не переносится с помощью PglB, первые попытки создать биоконъюгированную вакцину были сосредоточены на серотипе 4, где концевым остатком был распознаваемый GalNac. Акцептором был выбран нативный белок *C. jejuni* AcrA, в качестве ОСТ использовали PglB, клонированный в хромосому *E. coli* W3110. Полученный препарат защищал мышей при последующем инфицировании *S. pneumoniae* серотип 4 [39].

Следующий вариант биоконъюгированной вакцины создавался на базе нативных белков *S. pneumoniae*. Предполагалось, что это позволит создать гетерологичную защиту от неохваченных вакцинами серотипов и повысить иммунную защиту слизистых, стимулируя активацию Th17. Авторы протестировали на мышиных моделях эффективность 3-валентного биоконъюгата, в состав которого входили капсульный полисахарид ST4 и 3 белковых антигена *S. pneumoniae*: N-концевой фрагмент NanA, фактор вирулентности, который способствует росту и выживанию в носоглоточном тракте, инвазии эндотелиальных клеток головного мозга [40], Th17-стимулирующий антиген Sp0148 [41] и ABC-транспортер липопротеин PiuA [42]. Полученные с помощью PglB в *E. coli* биоконъюгаты индуцировали у мышей синтез антикапсулярных антител на уровне, соответствующем уже имеющимся вакцинам, а также вызывали сильные ответы на белковые антигены, которые распространялись и на другие, гетерологичные серотипы. Авторы отметили также, что экспрессия нескольких серотипов капсульных полисахаридов в *E. coli* открывает новые возможности для конструирования вакцин против *S. pneumoniae*. Например, в качестве платформы можно использовать гликозилированные везикулы наружных мембран (glyOMV) [43].

Ещё один прототип, на этот раз поливалентный, был создан с использованием в качестве основной ОСТ фермента PglS из *A. baylyi*, способного переносить глюкозный концевой остаток. В качестве белкового акцептора выступал естественный субстрат PglS, пилиноподобный белок ComP, который в *E. coli* гликозилировался капсульными полисахаридами *S. pneumoniae* CPS8, CPS9V и CPS14. Полученный препарат показал в предварительных тестах иммуногенность, сравнимую с иммуногенностью вакцины Превнар13. Кроме того, сыворотки мышей, иммунизированных полученным препаратом, проявляли бактерицидную активность против *S. pneumoniae* серотипов 14 и 8. Развивая идею, авторы сконструировали биоконъюгат на базе белкового носителя EPA, модифицировав его С-конец путём присоединения к нему акцепторной последовательности из 23 аминокислот белка ComP, и пневмококкового полисахарида CPS8. Полученный биоконъюгат вызывал у мышей активное образование антител класса IgG и обладал протективным действием [13]. В 2022 г. было показано, что полученный авторами биоконъюгат, получивший название CPS8-EPA^{iGTcc}, обладает высокой иммуногенностью, вызывает у мышей образование специфических для серотипа CPS8 антител класса IgM и IgG и обеспечивает защиту от инфицирования *S. pneumoniae* серотипа 8 [44].

Биоконъюгированные вакцины против других видов стрептококков

Разрабатываются также биоконъюгированные вакцины против патогенных стрептококков. Стрептококк группы B (СГВ, *S. agalactiae*, β-гемолитический стрептококк B) — это грамположительная условно-патогенная бактерия, которая чаще всего колонизирует нижние отделы желудочно-кишечного тракта и мочеполовой системы. Порядка 10–35% женщин заражены СГВ, что может приводить к различным острым заболеваниям у беременных и рожениц, а также к мертворождению [45]. СГВ также может передаваться новорождённому. Он обычно проявляется в виде B-стрептококковой болезни и может вызвать менингит, сепсис и пневмонию. Более того, недавние исследования показали, что СГВ также является причиной значительного числа заболеваний у взрослых людей, особенно старше 65 лет [46]. Всё это делает разработку вакцины против СГВ крайне необходимой. В связи с этим была сконструирована вакцина на базе PGCT. Характеристика 3-валентной биоконъюгированной вакцины, нацеленной на три наиболее распространённых в клинике серотипа СГБ: Ia, Ib, III, опубликована в работе J.A. Duke и соавт. [47]. Авторы внедрили в *E. coli* локусы, необходимые для экспрессии белка PglS из *A. baylyi*, что позволило провести гликозилирование сконструированного белка-носителя на базе EPA и белка ComP сиаловыми остатками согласно серотипам СГВ Ia, Ib и III. Дальнейшая иммунизация мышей полученным препаратом показала, что 3-валентная биоконъюгированная вакцина против СГВ вызывает продукцию специфических для задействованных серотипов антител класса IgG, которые обладают нейтрализующей способностью. Однако эффективность антител против разных серотипов, использованных при создании вакцины, различалась, и авторы предположили, что подобный эффект можно устранить путём изменения степени гликозилирования белка-носителя.

Технологии PGCT также могут быть применены и для создания вакцины от стрептококка группы A (*S. pyogenes,* или стрептококк A). *S. pyogenes* является чрезвычайно распространённым патогеном, вызывающим широкий круг заболеваний: от острого фарингита и импетиго до скарлатины и инвазивных заболеваний, таких как синдром токсического

шока или некротизирующий фасцит. Они приводят к развитию вторичных заболеваний аутоиммунной природы, например ревматических заболеваний сердца [48]. Кроме того, человек является единственным естественным хозяином *S. pyogenes*, следовательно, блокирование передачи этого патогена может привести к его полной элиминации. Стрептококк А, подобно *S. pneumoniae*, обладает высокой антигенной гетерогенностью. Серотипы определяются различиями в главном факторе вирулентности, белке М. Вследствие такой гетерогенности в поверхностных белках *S. pyogenes* исследователи сосредоточились на разработках конъюгированных вакцин на базе наружных полисахаридов патогена, в частности, полисахарида группы А. Однако R. Di Benedetto и соавт. показали, что для большей эффективности будущей вакцины необходимо сохранять белковые эпитопы носителей, т. к. случайное конъюгирование не влияло на синтез IgG к компоненту полисахарида группы А, но значительно снижало ответ на белковый компонент [49]. В результате случайной конъюгации полисахарида группы А с тремя белками *S. pyogenes* (SLO, SpyAD и SpyCEP) были получены конъюгаты, иммунизация которыми приводила к наработке антител, не блокирующих активность одного из использованных для конъюгации белков — SpyCEP. Он сохранял способность расщеплять интерлейкин-8. По-видимому, для создания эффективной вакцины на базе собственных белков *S. pyogenes* и его же полисахарида группы А потребуется обеспечить чрезвычайно высокую точность присоединения полисахарида к определённым участкам белков, что вполне может быть обеспечено при использовании PGCT [50].

Другие биоконъюгированные вакцины

Технологии PGCT используются при создании вакцины против *B. abortus* [51]. Данный патоген, хотя и является возбудителем преимущественно заболеваний сельскохозяйственных животных, тем не менее представляет опасность и для людей. Лицензированной вакцины, защищающей от инфицирования *B. abortus*, в настоящий момент нет. Существуют аттенуированные препараты, применяемые для защиты крупного (S19 и RB51) и мелкого (Rev1) рогатого скота [52]. Однако эти вакцины являются патогенными для человека, обладают остаточной токсичностью для животных и не защищают от всех известных видов возбудителя. Кроме того, для всех манипуляций с культурами бруцелл требуется оборудование высокого уровня биобезопасности из-за риска аэрозольной передачи. Чтобы избежать этих трудностей, для синтеза гликозилированных по типу *B. abortus* гликопротеинов нередко используют *Y. enterocolitica*, менее опасный оппортунистический патоген, поскольку О-полисахариды *Brucella* и *Y. enterocolitica* схожи [53]. В настоящий момент в высокой степени готовности находятся прототипы вакцин на основе холерного токсина В в качестве белкового носителя и О-полисахаридов *Y. enterocolitica*, синтезируемых в генетически модифицированных *E. coli* [52], а также на основе наночастиц Nano-B5 в качестве платформы и О-полисахаридов *Brucella* [54]. Продуцентом в последнем случае является *Y. enterocolitica*. В обеих вакцинах использована О-гликозилирующая система с центральной ОСТ PglL из *N. meningitides*. В обоих случаях исследователи сообщают об успешном применении полученных прототипов в доклинических исследованиях на мышах. При введении их животным наблюдались как повышенная продукция антител, так и активация клеточного иммунитета. Кроме того, оба прототипа продемонстрировали яркий защитный эффект иммунизации с последующим заражением мышей, а в случае нановакцины — даже против нескольких видов *Brucella*. Дальнейшие клинические исследования, очевидно, покажут применимость полученных препаратов для иммунизации людей.

Staphylococcus aureus является причиной многочисленных заболеваний человека, включая эндокардит, пневмонию и раневые инфекции. Особую опасность представляет собой метициллинрезистентный *S. aureus* (так называемые штаммы MRSA) [55]. В связи с этим существует острая необходимость в эффективной вакцинации против стафилококковой инфекции. В работе M. Wacker и соавт. привели результаты тестирования на мышах 3 конъюгатов, полученных с использованием технологий PGCT. По наименованию входящих в их состав компонентов они названы CP5-EPA, CP8-EPA и CP5-Hla, где CP5 и CP8 — капсульные полисахариды *S. aureus* серотипов 5 и 8 соответственно, EPA — экзотоксин А *P. aeruginosa*, а Hla — α-токсин *S. aureus*. В работе использовали PglB из *C. jejuni*. Биоконъюгаты были синтезированы в *E. coli*, после чего введены мышам. Все три прототипа вызывали индукцию антител на высоком уровне. При оценке защитной эффективности препаратов наилучшие результаты показал конъюгат CP5-Hla; введение CP5-Epa и CP8-Epa значительно снижало бактериемию; биоконъюгированная вакцина CP5-Hla защищала как от бактерий, так и от пневмонии со смертельным исходом.

Технология PGCT была применена для создания прототипов вакцин против *Francisella tularensis*, внутриклеточного патогена, вызывающего туляремию — потенциально смертельное заболевание. Для человека наиболее опасны два подвида: *F. tularensis tularensis* (тип А) и *F. tularensis holarctica* (тип В) [57]. Авторы с помощью PglB получили в *E. coli* биоконъюгат, состоящий из О-антигена *F. tularensis* и EPA, и испытали его на мышиной модели. Полученный рекомбинантный биоконъ-

югат отличался высоким выходом, стимулировал выработку специфических антител и обеспечивал защиту от последующего заражения вирулентным диким штаммом *F. tularensis* subsp. *holarctica* [58]. Авторы в дальнейшем провели модификацию носителя EPA, внеся в него дополнительно 8 акцепторных последовательностей, чтобы увеличить степень его гликозилированности [59]. Новый биоконъюгат действительно эффективнее стимулировал образование специфических антител, защищая крыс от развития заболевания при инфицировании *F. tularensis*. Исследователи планируют дальнейшие работы над представленным прототипом вакцины, намереваясь заменить белок-носитель EPA на нативные белковые антигены *F. tularensis*.

Ещё одна попытка создать новую вакцину против *F. tularensis* была сопряжена с использованием уже упоминавшейся экспериментальной технологии MAGIC [25]. В качестве ОСТ использовался PglB, белок-носитель — периплазматический Cmea из *C. jejuni*, для удобства выделения оснащённый вставкой 6His, полисахарид — О-антиген *F. tularensis.* Организм-продуцент — *E. coli*, все компоненты внедрялись в бактериальную хромосому. Работа продемонстрировала эффективность технологии MAGIC в получении высокоиммуногенных биоконъюгатов.

Заключение

Таким образом, биоконъюгация, равно как и другие современные технологии, активно применяется в разработке новых и совершенствовании уже имеющихся вакцин. Несмотря на существующие ограничения, данный метод может быть использован для создания препаратов, предотвращающих инфекционные заболевания, тем самым снижая распространение антибиотикорезистентных микроорганизмов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Hasso-Agopsowicz M., Hwang A., Hollm-Delgado M.G., et al. Identifying WHO global priority endemic pathogens for vaccine research and development (R&D) using multi-criteria decision analysis (MCDA): an objective of the Immunization Agenda 2030. *EBioMedicine*. 2024;110:105424. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2024.105424
2. WHO. Estimating the impact of vaccines in reducing antimicrobial resistance and antibiotic use;2024.
3. Szymanski C.M., Yao R., Ewing C.P., et al. Evidence for a system of general protein glycosylation in *Campylobacter jejuni*. *Mol. Microbiol*. 1999;32(5):1022–30. DOI: https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01415.x
4. Kowarik M., Numao S., Feldman M.F., et al. N-linked glycosylation of folded proteins by the bacterial oligosaccharyltransferase. *Science*. 2006;314(5802):1148–50. DOI: https://doi.org/10.1126/science.1134351
5. Bacon D.J., Szymanski C.M., Burr D.H., et al. A phase-variable capsule is involved in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Mol. Microbiol*. 2001;40(3):769–77. DOI: https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02431.x
6. Wacker M., Linton D., Hitchen P.G., et al. N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science*. 2002;298(5599):1790–3. DOI: https://doi.org/10.1126/science.298.5599.1790
7. Ihssen J., Kowarik M., Dilettoso S., et al. Production of glycoprotein vaccines in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact*. 2010;9:61. DOI: https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-61
8. Castric P. pilO, a gene required for glycosylation of *Pseudomonas aeruginosa* 1244 pilin. *Microbiology (Reading)*. 1995;141(Pt. 5):1247–54. DOI: https://doi.org/10.1099/13500872-141-5-1247
9. Power P.M., Seib K.L., Jennings M.P. Pilin glycosylation in *Neisseria meningitidis* occurs by a similar pathway to wzy-dependent O-antigen biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2006;347(4):904–8. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.06.182
10. Egge-Jacobsen W., Salomonsson E.N., Aas F.E., et al. O-linked glycosylation of the PilA pilin protein of *Francisella tularensis*: identification of the endogenous protein-targeting oligosaccharyltransferase and characterization of the native oligosaccharide. *J. Bacteriol*. 2011;193(19):5487–97. DOI: https://doi.org/10.1128/JB.00383-11
11. Harding C.M., Nasr M.A., Kinsella R.L., et al. *Acinetobacter* strains carry two functional oligosaccharyltransferases, one devoted exclusively to type IV pilin, and the other one dedicated to O-glycosylation of multiple proteins. *Mol. Microbiol*. 2015;96(5):1023–41. DOI: https://doi.org/10.1111/mmi.12986
12. Faridmoayer A., Fentabil M.A., Haurat M.F., et al. Extreme substrate promiscuity of the *Neisseria* oligosaccharyl transferase involved in protein O-glycosylation. *J. Biol. Chem*. 2008;283(50):34596–604. DOI: https://doi.org/10.1074/jbc.M807113200
13. Harding C.M., Nasr M.A., Scott N.E., et al. A platform for glycoengineering a polyvalent pneumococcal bioconjugate vaccine using *E. coli* as a host. *Nat. Commun*. 2019;10(1):891. DOI: https://doi.org/10.1038/s41467-019-08869-9
14. Platts-Mills J.A., Liu J., Rogawski E.T., et al. Use of quantitative molecular diagnostic methods to assess the aetiology, burden, and clinical characteristics of diarrhoea in children in low-resource settings: a reanalysis of the MAL-ED cohort study. *Lancet Glob. Health*. 2018;6(12):e1309–18. DOI: https://doi.org/10.1016/S2214-109X(18)30349-8
15. López-Vélez R., Lebens M., Bundy L., et al. Bacterial travellers' diarrhoea: a narrative review of literature published over the past 10 years. *Travel Med. Infect. Dis*. 2022;47:102293. DOI: https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2022.102293
16. Ravenscroft N., Haeuptle M.A., Kowarik M., et al. Purification and characterization of a *Shigella* conjugate vaccine, produced by glycoengineering *Escherichia coli*. *Glycobiology*. 2016;26(1): 51–62. DOI: https://doi.org/10.1093/glycob/cwv077
17. Hatz C.F., Bally B., Rohrer S., et al. Safety and immunogenicity of a candidate bioconjugate vaccine against *Shigella dysenteriae* type 1 administered to healthy adults: a single blind, partially randomized Phase I study. *Vaccine*. 2015;33(36):4594–601. DOI: https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.06.102
18. Martin P., Alaimo C. The ongoing journey of a *Shigella* bioconjugate vaccine. *Vaccines (Basel)*. 2022;10(2):212. DOI: https://doi.org/10.3390/vaccines10020212
19. Talaat K.R., Alaimo C., Martin P., et al. Human challenge study with a *Shigella* bioconjugate vaccine: analyses of clinical efficacy and correlate of protection. *EBioMedicine*. 2021;66:103310. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103310
20. Clarkson K.A., Porter C.K., Talaat K.R., et al. Shigella-specific immune profiles induced after parenteral immunization or oral challenge with either *Shigella flexneri* 2a or *Shigella sonnei*. *mSphere*. 2021;6(4):e0012221. DOI: https://doi.org/10.1128/mSphere.00122-21

21. Lu T., Das S., Howlader D.R., et al. Shigella vaccines: the continuing unmet challenge. *Int. J. Mol. Sci*. 2024;25(8):4329. DOI: https://doi.org/10.3390/ijms25084329
22. Rojas-Lopez M., Monterio R., Pizza M., et al. Intestinal pathogenic *Escherichia coli*: insights for vaccine development. *Front. Microbiol*. 2018;9:440. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00440
23. Ma Z., Zhang H., Shang W., et al. Glycoconjugate vaccine containing *Escherichia coli* O157:H7 O-antigen linked with maltose-binding protein elicits humoral and cellular responses. *PLoS One*. 2014;9(8):e105215. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105215
24. Fernandez S., Palmer D.R., Simmons M., et al. Potential role for Toll-like receptor 4 in mediating *Escherichia coli* maltose-binding protein activation of dendritic cells. *Infect. Immun*. 2007; 75(3):1359–63. DOI: https://doi.org/10.1128/IAI.00486-06
25. Abouelhadid S., Atkins E.R., Kay E.J., et al. Development of a novel glycoengineering platform for the rapid production of conjugate vaccines. *Microb. Cell Fact*. 2023;22(1):159. DOI: https://doi.org/10.1186/s12934-023-02125-y
26. Wren B., Cuccui J., Abouelhadid S. Glycosylation method. Patent № US 2015/0344928 A1. London;2015.
27. Dale A.P., Woodford N. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage and clones. *J. Infect*. 2015;71(6):615–26. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.09.009
28. Inoue M., Ogawa T., Tamura H., et al. Safety, tolerability and immunogenicity of the ExPEC4V (JNJ-63871860) vaccine for prevention of invasive extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* disease: A phase 1, randomized, double-blind, placebo-controlled study in healthy Japanese participants. *Hum. Vaccin. Immunother*. 2018;14(9):2150–7. DOI: https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1474316
29. Frenck R.W.Jr., Ervin J., Chu L., et al. Safety and immunogenicity of a vaccine for extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ESTELLA): a phase 2 randomised controlled trial. *Lancet Infect. Dis*. 2019;19(6):631–40. DOI: https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30803-X
30. Fierro C.A., Sarnecki M., Doua J., et al. Safety, reactogenicity, immunogenicity, and dose selection of 10-valent extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* bioconjugate vaccine (VAC52416) in adults aged 60–85 years in a randomized, multicenter, interventional, first-in-human, phase 1/2a study. *Open Forum Infect. Dis*. 2023;10(8):ofad417. DOI: https://doi.org/10.1093/ofid/ofad417
31. Phan M.D., Peters K.M., Sarkar S., et al. The serum resistome of a globally disseminated multidrug resistant uropathogenic *Escherichia coli* clone. *PLoS Genet*. 2013;9(10):e1003834. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003834
32. Kowarik M., Wetter M., Haeuptle M.A., et al. The development and characterization of an E. coli O25B bioconjugate vaccine. *Glycoconj. J*. 2021;38(4):421–35. DOI: https://doi.org/10.1007/s10719-021-09985-9
33. CDC. Antibiotic resistance threats in the United States;2019.
34. Feldman M.F., Mayer Bridwell A.E., Scott N.E., et al. A promising bioconjugate vaccine against hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2019;116(37):18655–63. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.1907833116
35. Follador R., Heinz E., Wyres K.L., et al. The diversity of *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharides. *Microb. Genom*. 2016;2(8):e000073. DOI: https://doi.org/10.1099/mgen.0.000073
36. Wantuch P.L., Knoot C.J., Robinson L.S., et al. Capsular polysaccharide inhibits vaccine-induced O-antigen antibody binding and function across both classical and hypervirulent K2:O1 strains of *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS Pathog*. 2023;19(5):e1011367. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011367
37. Liu Y., Pan C., Wang K., et al. Preparation of a *Klebsiella pneumoniae* conjugate nanovaccine using glycol-engineered *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact*. 2023;22(1):95. DOI: https://doi.org/10.1186/s12934-023-02099-x
38. Sari R.F., Fadilah F., Maladan Y., et al. A narrative review of genomic characteristics, serotype, immunogenicity, and vaccine development of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide. *Clin. Exp. Vaccine Res*. 2024;13(2):91–104. DOI: https://doi.org/10.7774/cevr.2024.13.2.91
39. Herbert J.A., Kay E.J., Faustini S.E., et al. Production and efficacy of a low-cost recombinant pneumococcal protein polysaccharide conjugate vaccine. *Vaccine*. 2018;36(26):3809–19. DOI: https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.05.036
40. Wren J.T., Blevins L.K., Pang B., et al. Pneumococcal neuraminidase A (NanA) promotes biofilm formation and synergizes with influenza A virus in nasal colonization and middle ear infection. *Infect. Immun*. 2017;85(4):e01044–16. DOI: https://doi.org/10.1128/IAI.01044-16
41. Moffitt K.L., Gierahn T.M., Lu Y.J., et al. T(H)17-based vaccine design for prevention of *Streptococcus pneumoniae* colonization. *Cell Host Microbe*. 2011;9(2):158–65. DOI: https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.01.007
42. Ogunniyi A.D., Mahdi L.K., Trappetti C., et al. Identification of genes that contribute to the pathogenesis of invasive pneumococcal disease by *in vivo* transcriptomic analysis. *Infect. Immun*. 2012; 80(9):3268–78. DOI: https://doi.org/10.1128/IAI.00295-12
43. Reglinski M., Ercoli G., Plumptre C., et al. A recombinant conjugated pneumococcal vaccine that protects against murine infections with a similar efficacy to Prevnar-13. *NPJ Vaccines*. 2018;3:53. DOI: https://doi.org/10.1038/s41541-018-0090-4
44. Aceil J., Paschall A.V., Knoot C.J., et al. Immunogenicity and protective efficacy of a prototype pneumococcal bioconjugate vaccine. *Vaccine*. 2022;40(42):6107–13. DOI: https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.09.018
45. Russell N.J., Seale A.C., O'Driscoll M., et al. Maternal colonization with group B *Streptococcus* and serotype distribution worldwide: systematic review and meta-analyses. *Clin. Infect. Dis*. 2017;65(Suppl. 2):S100–S11. DOI: https://doi.org/10.1093/cid/cix658
46. McLaughlin J.M., Peyrani P., Furmanek S., et al. Burden of adults hospitalized with group B *Streptococcal* infection. *J. Infect. Dis*. 2021;224(7):1170–8. DOI: https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa110
47. Duke J.A., Paschall A.V., Robinson L.S., et al. Development and immunogenicity of a prototype multivalent group B *Streptococcus* bioconjugate vaccine. *ACS Infect. Dis*. 2021;7(11):3111–23. DOI: https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.1c00415
48. Watkins D.A., Johnson C.O., Colquhoun S.M., et al. Global, regional, and national burden of rheumatic heart disease, 1990–2015. *N. Engl. J. Med*. 2017;377(8):713–22. DOI: https://doi.org/10.1056/NEJMoa1603693
49. Di Benedetto R., Mancini F., Carducci M., et al. Rational design of a glycoconjugate vaccine against group A Streptococcus. *Int. J. Mol. Sci*. 2020;21(22):8558. DOI: https://doi.org/10.3390/ijms21228558
50. Burns K., Dorfmueller H.C., Wren B.W., et al. Progress towards a glycoconjugate vaccine against group A Streptococcus. *NPJ Vaccines*. 2023;8(1):48. DOI: https://doi.org/10.1038/s41541-023-00639-5
51. Li S., Huang J., Wang K., et al. A bioconjugate vaccine against *Brucella abortus* produced by engineered *Escherichia coli*. *Front. Bioeng. Biotechnol*. 2023;11:1121074. DOI: https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1121074
52. Oliveira S.C., Giambartolomei G.H., Cassataro J. Confronting the barriers to develop novel vaccines against brucellosis. *Expert. Rev. Vaccines*. 2011;10(9):1291–305. DOI: https://doi.org/10.1586/erv.11.110
53. Skurnik M., Biedzka-Sarek M., Lübeck P.S., et al. Characterization and biological role of the O-polysaccharide gene cluster of *Yersinia enterocolitica* serotype O:9. *J. Bacteriol*.

2007;189(20):7244–53.
DOI: https://doi.org/10.1128/JB.00605-07
54. Huang J., Guo Y., Yu S., et al. One-step preparation of a self-assembled bioconjugate nanovaccine against *Brucella*. *Virulence*. 2023;14(1):2280377.
DOI: https://doi.org/10.1080/21505594.2023.2280377
55. Bassetti M., Nicco E., Mikulska M. Why is community-associated MRSA spreading across the world and how will it change clinical practice? *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2009;34(Suppl. 1): S15–9. DOI: https://doi.org/10.1016/S0924-8579(09)70544-8
56. Wacker M., Wang L., Kowarik M., et al. Prevention of *Staphylococcus aureus* infections by glycoprotein vaccines synthesized in *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis*. 2014;209(10):1551–61. DOI: https://doi.org/10.1093/infdis/jit800
57. McLendon M.K., Apicella M.A., Allen L.A. *Francisella tularensis*: taxonomy, genetics, and immunopathogenesis of a potential agent of biowarfare. *Annu. Rev. Microbiol*. 2006;60:167–85. DOI: https://doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142126
58. Cuccui J., Thomas R.M., Moule M.G., et al. Exploitation of bacterial N-linked glycosylation to develop a novel recombinant glycoconjugate vaccine against *Francisella tularensis*. *Open Biol*. 2013;3(5):130002.
DOI: https://doi.org/10.1098/rsob.130002
59. Prior J.L., Prior R.G., Hitchen P.G., et al. Characterization of the O antigen gene cluster and structural analysis of the O antigen of *Francisella tularensis* subsp. tularensis. *J. Med. Microbiol*. 2003;52(Pt. 10):845–51.
DOI: https://doi.org/10.1099/jmm.0.05184-0

Информация об авторах

Цыганова Мария Игоревна✉ — канд. биол. наук, в. н. с. лаб. иммунохимии ННИИЭМ им. акад. И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия, maria_che@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-2811-6844

Новиков Дмитрий Викторович — канд. биол. наук, в. н. с. лаб. иммунохимии ННИИЭМ им. акад. И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия, novikov.dv75@mail.ru,
https://orcid.org/0000-0001-7049-6935

Новиков Виктор Владимирович — д-р биол. наук, проф., зав. лаб. иммунохимии ННИИЭМ им. акад. И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия, mbre@mail.ru,
https://orcid.org/0000-0002-2449-7213

Караулов Александр Викторович — д-р мед. наук, проф., академик РАН, зав. лаб. иммунопатологии Института молекулярной медицины, зав. каф. клинической иммунологии и аллергологии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия, drkaraulov@mail.ru,
https://orcid.org/0000-0002-1930-5424

Участие авторов: *Цыганова М.И.* — разработка концепции статьи, написание статьи; *Новиков Д.В.* — разработка концепции и дизайна исследования, анализ литературы, написание статьи; *Новиков В.В.* — разработка концепции статьи, анализ литературы, редактирование статьи; *Караулов А.А.* — разработка концепции статьи, редактирование 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 19.05.2025;
принята к публикации 21.07.2025;
опубликована 28.08.2025

Information about the authors

Maria I. Tsyganova✉ — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of immunochemistry, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia, maria_che@mail.ru,
https://orcid.org/0000-0002-2811-6844

Dmitry V. Novikov — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of immunochemistry, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia, novikov.dv75@mail.ru,
https://orcid.org/0000-0001-7049-6935

Viktor V. Novikov — Dr. Sci. (Biol.), Professor, Head, Laboratory of immunochemistry, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia, mbre@mail.ru,
https://orcid.org/0000-0002-2449-7213

Alexander V. Karaulov — Dr. Sci. (Med.), Professor, RAS Full Member, Head, Laboratory of immunopathology, Institute of Molecular Medicine, Head, Department of clinical immunology and allergy, N.V. Sklifosovsky Institute of Clinical Medicine, Sechenov First Moscow Medical University, Moscow, Russia, drkaraulov@mail.ru,
https://orcid.org/0000-0002-1930-5424

Authors' contribution: *Tsyganova M.I.* — developing the concept of the article, writing the article; *Novikov D.V.* — development of the research concept and design, literature analysis, writing the article; *Novikov V.V.* — article concept development, literature analysis, article editing; *Karaulov A.A.* — developing the concept of the article, editing 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 19.05.2025;
accepted for publication 21.07.2025;
published 28.08.2025

К 80-летию со дня рождения Олега Ивановича Киселева

Олег Иванович Киселев родился 5 сентября 1945 г. в Магнитогорске в семье журналиста Ивана Яковлевича Киселева и преподавателя русского языка и литературы Галины Григорьевны Киселевой. В 1962 г. окончил школу в Челябинске, а в 1968 г. — с отличием Первый Ленинградский медицинский институт им. И.П. Павлова, получив официальную рекомендацию для поступления в аспирантуру. С институтской скамьи Олег Иванович увлекался микробиологией и биохимией. Он поступил в аспирантуру в лабораторию биохимической генетики Института экспериментальной медицины АМН СССР и уже в 1971 г. успешно защитил диссертацию на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности «Биохимия». Продолжив работать в Институте экспериментальной медицины, в 1982 г. Олег Иванович защитил докторскую диссертацию «Белоксинтезирующие структуры митохондрий и топография биосинтеза митохондриальных белков» по специальности «Биологическая химия».

С 1983 г. он продолжил свой научный путь в учреждениях Главного управления микробиологической промышленности при Совете Министров СССР (Главмикробиопром) и Министерства медицинской и микробиологической промышленности СССР, став руководителем Отделения генной инженерии при Главмикробиопроме. Этот период творческого пути О.И. Киселева был сфокусирован на вопросах генной инженерии и промышленной биотехнологии. Основные работы были посвящены клонированию и экспрессии генов интерферонов и цитокинов (интерлейкин-2).

В 1988 г. Олег Иванович совмещал работу в Институте эволюционной физиологии и биохимии РАН, где заведовал лабораторией молекулярных основ эволюции. Основная область его интересов сместилась в сторону изучения эволюции вирусов. Тогда же, в 1988 г. по предложению Министра здравоохранения СССР академика Е.И. Чазова О.И. Киселев был назначен директором НИИ гриппа. Вместе с назначением было подписано постановление о переводе всего отделения генной инженерии из Министерства медицинской и микробиологической промышленности в структуру НИИ гриппа.

В 1998 г. Олег Иванович получил звание профессора по специальности «Биохимия», в 2000 г. — избран членом-корреспондентом РАМН, а в 2005 г. — академиком РАМН по специальности «Молекулярная вирусология» (с 2013 г. — академик РАН).

За время работы в НИИ гриппа основные направления научных исследований Олега Ивановича относились к области молекулярной биологии вирусов, генной инженерии иммунобиологических препаратов, дизайну и исследованию молекулярных механизмов действия химиопрепаратов. Им создана своя научная школа по молекулярной вирусологии, под его руководством защищены 11 кандидатских и 4 докторских диссертации, опубликовано более 350 научных работ, включая 20 монографий, 45 патентов на изобретения и 11 сборников.

Олег Иванович систематизировал современные представления о потенциальных лекарственных мишенях в репликативном цикле вирусов, внёс вклад в молекулярно-генетическое обоснование терапии гриппа этиотропными препаратами. Благодаря сотрудничеству с Институтом органического синтеза УрО РАН и Уральским федеральным университетом было разработано новое поколение противовирусных препаратов на основе нитроазолоазинов, проведён скрининг соединений данного класса и осуществлён выбор соединения — лидера препарата триазавирин, проведены уникальные работы по расшифровке механизма действия препарата.

Олег Иванович внёс важнейший вклад в разработку иммунобиологических препаратов против гриппа и туберкулёза, лично выступал как популя-

ризатор широкого внедрения в практику вакцинопрофилактики гриппа и других инфекционных болезней.

Академик О.И. Киселев плодотворно сотрудничал с зарубежными научными коллективами и развивал международное сотрудничество НИИ гриппа; был одним из ведущих специалистов в области биологической безопасности и биотерроризма. Внёс значительный вклад в создание проектов по линии Российско-Вьетнамского тропического центра.

Отдельно необходимо отметить его значительный вклад в развитие сотрудничества с Всемирной организацией здравоохранения по вопросам надзора и контроля за гриппом и острыми респираторными заболеваниями на территории России. Длительная работа в составе комиссий ВОЗ по подготовке к пандемии гриппа способствовала укреплению авторитета и признанию России как страны с высоким уровнем решения проблем защиты населения от пандемии гриппа, ведущим в мире производителем противогриппозных вакцин и противовирусных препаратов.

Заслуги Олега Ивановича Киселева по достоинству были оценены государством: он лауреат премии Правительства РФ 2004 г. в области науки и техники; в 2004 г. награждён медалью Ордена «За заслуги перед Отечеством» II степени; в 2014 г. получил звание заслуженного деятеля науки Российской Федерации.

Олег Иванович активно готовил высококвалифицированные научные кадры и оставил после себя целую плеяду учеников, продолживших традиции его школы молекулярной вирусологии. Они считают делом чести сохранить и преумножить наследие академика О.И. Киселева и всё самое ценное из него передать следующим поколениям сотрудников Института и своим ученикам. Все они видят своё призвание в решении актуальных проблем здравоохранения.

Академик О.И. Киселев, безвременно ушедший 24 ноября 2015 г., — один из наиболее ярких представителей медицинской науки, объединявший в себе фундаментальные представления о медицине и биологии, внёс существенный вклад в решение многих фундаментальных и прикладных задач в области молекулярной вирусологии, генной инженерии, химиотерапии, профилактики и эпидемиологии гриппа и других вирусных инфекций. Коллеги вспоминают его с восхищением и теплотой как человека, который любил и умел жить, подавал самоотверженный пример настоящего учёного, выполнявшего свой долг, несмотря ни на какие трудности, отстаивал интересы страны на международной арене и развивал научную кооперацию с ведущими учёными по всему миру.

Светлая память академику О.И. Киселеву.

Коллектив сотрудников ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России