

5

СЕНТЯБРЬ—ОКТАБРЬ

Том 102
2025

Ж
М
Э
И

ЖУРНАЛ МИКРОБИОЛОГИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ИММУНОБИОЛОГИИ

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

JOURNAL

OF MICROBIOLOGY
EPIDEMIOLOGY
AND
IMMUNOBIOLOGY

5

SEPTEMBER — OCTOBER

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).

Уровень У1 в Едином государственном перечне научных изданий.

5

СЕНТЯБРЬ – ОКТЯБРЬ

**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, CNKI. Academic Reference.

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://proemp.ru>

ИЗДАТЕЛЬ:

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

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

Начальник редакционно-
издательского отдела:
Осокина Ольга Владимировна

РЕДАКЦИЯ:

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

Заведующая редакцией:

Устинкова Ольга Владимировна

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

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

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

Подписано в печать 28.06.2025.
Формат 60×90^{1/4}. Тираж 158 экз.
Усл.-печ. л. 17,5.

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

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

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

Заместители главного редактора

Семененко Т.А., д.м.н., проф., Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

Макарова М.А., д.м.н., Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Ответственный секретарь

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Российские члены редакционной коллегии

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Иностранные члены редакционной коллегии

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

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

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

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

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

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

Лукашев А.Н., д.м.н., проф., член-корр. РАН, Институт медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Малеев В.В., д.м.н., проф., акад. РАН, советник директора, Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Михайлов М.И., д.м.н., проф., акад. РАН, Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва; Белгородский государственный университет, Белгород, Россия

Несвижский Ю.В., д.м.н., проф., Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

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

Свитич О.А., д.м.н., акад. РАН, Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

Тартаковский И.С., д.б.н., проф., Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

Тотолян А.А., д.м.н., проф., акад. РАН, Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Черкасов С.В., д.м.н., проф., член-корр. РАН, Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения РАН, Оренбург, Россия

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 Gıyas oğlu Mammadov, MD, DSc, Professor, National Oncology Center of the Ministry of Health of the Republic of Azerbaijan, Baku, Republic of Azerbaijan

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

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

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

16+

© ФБУН ЦНИИ эпидемиологии
Роспотребнадзора, 2025

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

JOURNAL of MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY

(Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii)

Bimonthly scientific and practical journal

Founded in 1924

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

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

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

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

of Education and Science:

- 1.5.10. Virology (medical and biological sciences);
- 1.5.11. Microbiology (medical and biological sciences);
- 3.2.2. Epidemiology (medical and biological sciences);
- 3.2.7. Clinical immunology, Allergology (medical and sciences).

Level U1 in the Unified State List of Scientific Publications.

5

SEPTEMBER – OCTOBER

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

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://npoepp.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'yedinenny poligraficheskiy kompleks Ltd.115114, 7C2, Derbenevskaya emb., Moscow, Russian Federation.

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

EDITOR-IN-CHIEF

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

Deputy Editors

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

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

Executive Secretary

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

EDITORIAL BOARD

Russian members of the Editorial Board

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Karen K. Kyuregyan, D. Sci. (Biology), Professor, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

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

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

Alexander N. Lukashev, RAS Corr. Member, Professor, D. Sci. (Medicine), Martsinovskiy Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector-Borne Diseases, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

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

Mikhail I. Mikhaylov, RAS Full Member, Professor, D. Sci. (Medicine), I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Belgorod State University, Belgorod, Russia

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

Yury V. Nesvizhsky, Professor, D. Sci. (Med.), I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Oxana A. Svitich, RAS Full Member, Professor, D. Sci. (Medicine), I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Igor S. Tartakovskiy, Professor, D. Sci. (Biology), N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Areg A. Totolian, RAS Full Member, Professor, D. Sci. (Medicine), Saint-Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia

Sergey V. Cherkasov, RAS Corr. Member, Professor, D. Sci. (Medicine), Orenburg Federal Research Center, Ural Branch of RAS, Orenburg, Russia

Foreign members of the Editorial Board

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

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

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

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

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

EDITORIAL COUNCIL

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

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

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

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

Alexandra A. Nikonova, Cand. Sci. (Biology), I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

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

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Попова А.Ю., Аюпова А.Ф., Говорун В.М., Горбачёва А.А., Ильина Е.Н., Качалов В.Н., Козлов И.Е., Ключков К.А., Кутырев В.В., Лукашев А.Н., Манолов А.И., Маслова И.И., Самойлов А.Е., Сафронов В.А., Цуркус В.И.**
ПОЭМА: ПОпуляционная Эпидемиологическая Модель Агентная для прогноза эффективности противоэпидемических мероприятий в Российской Федерации* 515
- Останкова Ю.В., Давыденко В.С., Щемелев А.Н., Тотолян А.А.**
Ассоциация полиморфных вариантов гена *TRIM22* (N155D и T242R) с ВИЧ-инфекцией в Северо-Западном федеральном округе России* 530
- Сирица Ю.В., Ульшина Д.В., Волынкина А.С., Васильева О.В., Гнусарева О.А., Михайлова М.Е., Куличенко А.Н.**
Генетическое типирование ДНК изолятов *Coxiella burnetii*, выделенных от больных лихорадкой Ку в Ставропольском крае* 539
- Капотина Л.Н., Моргунова Е.Ю., Нелюбина С.А., Федина Е.Д., Королёва Е.А., Бондарева Н.Е., Перепанова Т.С., Зигангирова Н.А.**
Подавление образования биоплёнок и выживания в эпителиальных клетках клинических изолятов уропатогенов при действии препарата Fluorothiazinone *in vitro** 547
- Соловьева И.В., Точилина А.Г., Белова И.В., Зайцева Н.Н., Кучеренко Н.С., Садыкова Н.А., Молодцова С.Б., Кропотов В.С.**
Характеристика молекулярно-генетических свойств эпидемических штаммов *Klebsiella pneumoniae* и *Staphylococcus aureus* — возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, циркулирующих на территории Нижегородской области* 560
- Боргоякова М.Б., Рудомётов А.П., Старостина Е.В., Яковлев В.А., Тигеева Е.В., Зайковская А.В., Волосникова Е.А., Меркульева Ю.А., Исаева А.А., Несмеянова В.С., Шаньшин Д.В., Зайцев Б.Н., Кисаков Д.Н., Кисакова Л.А., Щербаков Д.Н., Карпенко Л.И., Ильичёв А.А.**
Комбинированная ДНК-белковая вакцина, содержащая полиэпитопный Т-клеточный иммуноген и рецептор-связывающий домен белка S вируса SARS-CoV-2* 571
- Ковалевич А.А., Водопьянов А.С., Писанов Р.В.**
Критерии оценки качества геномов *Pseudomonas aeruginosa** 583
- Куликов С.В., Медкова А.Ю., Локтев М.А., Синяшина Л.Н., Каратаев Г.И.**
Генетическое разнообразие мутаций, влияющих на гемолитическую активность бактерий *Bordetella pertussis* при культивировании *in vitro** 592
- Господарик А.В., Прохорова Н.Д., Куликова В.К., Калачнюк Т.Н., Хромых Н.И., Кудрявцева Ю.В., Беспятовых Ю.А.**
Мониторинг *Clostridioides difficile*-ассоциированной инфекции в условиях стационара* 605
- Леденева М.Л., Бондарева О.С., Ткаченко Г.А., Устинов Д.В., Захарова И.Б.**
Совершенствование схемы MLVA-типирования штаммов *Burkholderia mallei** 615

ОБЗОРЫ

- Лопатухина М.А., Кюрегян К.К., Михайлов М.И.**
Иммунологическая и эпидемиологическая эффективность вакцинации детей против гепатита А с применением одной дозы инактивированной вакцины* 626
- Захарова Ю.А., Новиков В.А., Андреев С.В., Макарова М.А.**
Защитные перчатки нового поколения: актуальные тенденции технологических решений и перспективы применения (научный обзор)* 635

ЮБИЛЕИ

- К 70-летию академика РАН Александра Николаевича Куличенко 647

ХРОНИКА

- Резолюция Конгресса с международным участием «Эпидемиология — 2025» (Москва, 15–16 октября 2025 г.) 649

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

CONTENTS

ORIGINAL RESEARCHES

- Popova A.Yu., Ayupova A.F., Govorun V.M., Gorbacheva A.A., Ilina E.N., Kachalov V.N., Kozov I.E., Klochkov K.A., Kutyrev V.V., Lukashev A.N., Manolov A.I., Maslova I.I., Samoilov A.E., Safronov V.A., Tsurkis V.I.**
POEM: POpulation Epidemiological Model for anti-epidemic measures efficiency prognosis in the Russian Federation* 515
- Ostankova Yu.V., Davydenko V.S., Schemelev A.N., Totolian A.A.**
Association of *TRIM22* gene polymorphisms (*N155D* and *T242R*) with HIV infection in the Northwestern Federal District of Russia* 530
- Sirtsya Yu.V., Ul'shina D.V., Volinkina A.S., Vasilieva O.V., Gnusareva O.A., Mikhailova M.E., Kulichenko A.N.**
Genetic typing of DNA of isolates of *Coxiella burnetii* isolated from patients with Q fever in the Stavropol Territory* 539
- Kapotina L.N., Morgunova E.Yu., Nelyubina S.A., Fedina E.D., Koroleva E.A., Bondareva N.E., Perepanova T.S., Zigangirova N.A.**
Suppression of biofilm formation and survival of clinical isolates of uropathogens within epithelial cells under the effect of Fluorothiazinone *in vitro** 547
- Solovyeva I.V., Tochilina A.G., Belova I.V., Zaitseva N.N., Kucherenko N.S., Sadykova N.A., Molodtsova S.B., Kropotov V.S.**
Characterization of the molecular genetic properties of epidemic strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*, the pathogens of healthcare-associated infections circulating in the Nizhny Novgorod region* 560
- Borgoyakova M.B., Rudometov A.P., Starostina E.V., Yakovlev V.A., Tigeeva E.V., Zaykovskaya A.V., Volosnikova E.A., Merkuleva I.A., Isaeva A.A., Nesmeyanova V.S., Shanshin D.V., Zaitsev B.N., Kisakov D.N., Kisakova L.A., Shcherbakov D.N., Karpenko L.I., Ilyichev A.A.**
DNA-protein COVID-19 combination vaccine containing multiepitope T-cell immunogen and receptor binding domain of the SARS-CoV-2 S protein* 571
- Kovalevich A.A., Vodopianov A.S., Pisanov R.V.**
Criteria for assessment of the quality of *Pseudomonas aeruginosa* genome sequences* 583
- Kulikov S.V., Medkova A.Yu., Loklev M.A., Sinyashina L.N., Karataev G.I.**
Genetic diversity of mutations affecting the hemolytic activity of *Bordetella pertussis* bacteria during *in vitro* cultivation* 592
- Gospodarik A.V., Prokhorova N.D., Kulikova V.K., Kalachnuk T.N., Khromykh N.I., Kudryavtseva J.V., Bespyatykh J.A.**
Monitoring for *Clostridioides difficile*-associated infection in hospital* 605
- Ledeneva M.L., Bondareva O.S., Tkachenko G.A., Ustinov D.V., Zakharova I.B.**
Improvement of the MLVA typing scheme for *Burkholderia mallei* strains* 615

REVIEWS

- Lopatukhina M.A., Kyuregyan K.K., Mikhailov M.I.**
Immunological and epidemiological effectiveness of pediatric vaccination against hepatitis A using a single dose of inactivated vaccine* 626
- Zakharova Yu.A., Novikov V.A., Andreev S.V., Makarova M.A.**
Next-generation protective gloves: current trends in technological solutions and application prospects (scientific review)* 635

ANNIVERSARIES

- On the 70th anniversary of Academician of the Russian Academy of Sciences Alexander Nikolaevich Kulichenko 647

CHRONICLE

- Resolution of the Congress with international participation "Epidemiology — 2025" (Moscow, October 15–16, 2025) 649

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

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оригинальное исследование

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-760>



ПОЭМА: ПОпуляционная Эпидемиологическая Модель Агентная для прогноза эффективности противоэпидемических мероприятий в Российской Федерации

Попова А.Ю.¹, Аюпова А.Ф.², Говорун В.М.², Горбачёва А.А.², Ильина Е.Н.²,
Качалов В.Н.^{2,3}, Козлов И.Е.², Клочков К.А.^{2,3}, Кутырев В.В.⁴, Лукашев А.Н.^{2,5},
Манолов А.И.², Маслова И.И.², Самойлов А.Е.^{2,5}, Сафронов В.А.⁴, Цуркис В.И.²

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

²Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины, Москва, Россия;

³Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия;

⁴Российский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия;

⁵Институт медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского
Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова, Москва, Россия

Аннотация

Введение. Пандемия COVID-19 выявила целый комплекс проблем, связанных с математическим моделированием эпидемического процесса и оценкой эффекта от проводимых профилактических и противоэпидемических мероприятий в современном сложном организованном обществе. Вместе с этим накопление значительных массивов фактических данных дало импульс активному развитию агентных моделей, в которых каждый агент (условный человек) имеет уникальный набор характеристик и способов взаимодействия, определяемых на основе реальных социологических и демографических данных.

Цели и задачи. Разработка и демонстрация возможностей эпидемиологической агентной модели ПОЭМА (ПОпуляционная Эпидемиологическая Модель Агентная).

Материалы и методы. Платформа ПОЭМА разработана на исходном коде одной из наиболее широко используемых во всем мире агентной модели Covasim с учетом демографических и организационно-административных условий, характерных для Российской Федерации.

Результаты. Вычислительные эксперименты показали, что из-за индивидуальной вариативности в динамике развития инфекции и особенностей регистрации заболеваемости даже массовые мероприятия хотя и приводят к фактическому увеличению числа инфицированных, но не оказывают существенного влияния на форму кривой регистрируемой заболеваемости. Показано, что транспортные потоки между городами на уровне 0,1% населения в день оказывают минимальный эффект на динамику развития эпидемии, в то время как эффект от перетока 1% населения в день резко снижает эффект от введения строгих противоэпидемических мероприятий, проводимых только в одном отдельно взятом городе. На примере Воронежской области проведено моделирование смены циркулирующего варианта SARS-CoV-2 с Дельта на Омисрон в начале 2022 г. и показана высокая степень корреляции между модельной динамикой и наблюдаемым в реальности соотношением вариантов вируса.

Заключение. Модель реализована полностью в Российском контуре на сервере НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора и может быть использована для проведения цифровых эпидемиологических экспериментов с целью прогноза эффективности предполагаемых к проведению противоэпидемических мероприятий.

Ключевые слова: агентное моделирование, вычислительная эпидемиология, эпидемический процесс, противоэпидемические меры

Источник финансирования. Работа поддержана субсидией Роспотребнадзора № 141-02-2023-208.

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

Для цитирования: Попова А.Ю., Аюпова А.Ф., Говорун В.М., Горбачёва А.А., Ильина Е.Н., Качалов В.Н., Козлов И.Е., Клочков К.А., Кутырев В.В., Лукашев А.Н., Манолов А.И., Маслова И.И., Самойлов А.Е., Сафронов В.А., Цуркис В.И. ПОЭМА: ПОпуляционная Эпидемиологическая Модель Агентная для прогноза эффективности противоэпидемических мероприятий в Российской Федерации. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2025;102(5):515–529.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-760>

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

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-760>

POEM: POpulation Epidemiological Model for anti-epidemic measures efficiency prognosis in the Russian Federation

Anna Yu. Popova¹, Asiya F. Ayupova², Vadim M. Govorun², Alina A. Gorbacheva², Elena N. Ilina², Viacheslav N. Kachalov^{2,3}, Ivan E. Kozlov², Konstantin A. Klochkov^{2,3}, Vladimir V. Kuttyrev⁴, Alexander N. Lukashev^{2,5}, Alexander I. Manolov², Irina I. Maslova², Andrei E. Samoilov², Valentin A. Safronov⁴, Vera I. Tsurkis².

¹Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russia;

²Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow, Russia;

³Moscow Institute of Physics and Technology, National Research University, Dolgoprudny, Russia;

⁴Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia;

⁵Martsinovskiy Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector Borne Diseases, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. The COVID-19 pandemic has revealed a whole complex of problems related to mathematical modeling of the epidemic process and assessing the effect of preventive and anti-epidemic measures in modern complex societies. Along with this, the accumulation of significant factual data has spurred the active development of agent-based models, in which each agent (a hypothetical person) has a unique set of characteristics and interaction methods determined based on real sociological and demographic data.

Aim and objectives. Development and demonstration of the capabilities of the epidemiological agent-based model POEM platform (POpulation Epidemiological Model).

Materials and methods. The POEM platform is developed based on the source code of one of the most widely used agent-based models worldwide, Covasim, taking into account the demographic and organizational-administrative conditions specific to the Russian Federation.

Results. Computational experiments have shown that due to individual variability in the dynamics of infection development and the specifics of disease registration, even mass events, while leading to an actual increase in the number of infected individuals, do not have a significant impact on the shape of the curve of registered disease incidence. It has been shown that intercity traffic flows at a level of 0.1% of the population per day have a minimal effect on the dynamics of the epidemic's development, while the effect of a 1% population outflow per day sharply reduces the effect of strict anti-epidemic measures implemented in only one particular city. Using the example of the Voronezh region, the transition from the Delta variant to Omicron in early 2022 was modeled, and a high degree of correlation was shown between the model dynamics and the actual ratio of virus variants observed.

Conclusion. The model is fully implemented within the Russian system on the server of the Research Institute for System Biology and Medicine of Rospotrebnadzor and can be used to conduct digital epidemiological experiments to predict the effectiveness of proposed anti-epidemic measures.

Keywords: agent-based modeling, computational epidemiology, epidemic process, anti-epidemic measures

Funding source. The work was supported by Rospotrebnadzor subsidy No. 141-02-2023-208.

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

For citation: Popova A.Yu., Ayupova A.F., Govorun V.M., Gorbacheva A.A., Ilina E.N., Kachalov V.N., Kozov I.E., Klochkov K.A., Kuttyrev V.V., Lukashev A.N., Manolov A.I., Maslova I.I., Samoilov A.E., Safronov V.A., Tsurkis V.I. POEM: POpulation Epidemiological Model for anti-epidemic measures efficiency prognosis in the Russian Federation. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(5):515–529.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-760>

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

Введение

Пандемия COVID-19 показала, что социально-экономические факторы являются объективным ограничением при реализации необходимого комплекса противоэпидемических мероприятий.

Разные страны выбрали различные подходы к предотвращению распространения новой коронавирусной инфекции, во всех случаях аргументируя обоснованность принимаемых решений. На этом фоне стала очевидной потребность в вычислительных

эпидемиологических моделях, которые позволили бы максимально объективно оценивать потенциальный эффект отдельных противоэпидемических мероприятий и соотносить его с социально-экономическими потерями от эпидемии. Таким образом, пандемия COVID-19 послужила стимулом для развития методов компьютерного моделирования эпидемий.

Вычислительные модели для изучения распространения инфекционных болезней можно разделить на два основных типа: компартментные и агентные. Компартментные модели появились почти 100 лет назад и активно использовались благодаря скорости и лёгкости выполнения расчётов. В базовой компартментной модели (SIR — Susceptible, Infected, Recovered — восприимчивые, инфицированные, выздоровевшие) все индивидуумы одинаковые и могут находиться только в трех состояниях. Хотя описаны модификации SIR-модели для анализа дополнительных параметров, учёт индивидуальных комбинаций свойств субъектов, составляющих популяцию, практически не осуществляется. Агентные модели позволяют наделить каждого из виртуальных субъектов уникальными характеристиками любой сложности. Они намного более затратные в вычислительном отношении, но позволяют создавать цифровую среду, наиболее точно воспроизводящую условия развития эпидемического процесса [1].

Сложность разработки привела к распространению практики использования готовых агентных моделей с открытым кодом, который дорабатывается пользователем для решения спектра конкретных задач. Из рассмотренных основных вычислительных подходов к созданию искусственных популяций, агентом которых выступает человек, наибольшее распространение в моделировании респираторных инфекций получили платформы FRED [2], AceMod и Covasim [3].

Платформа с открытым кодом Covasim выгодно отличается тем, что содержит множество встроенных алгоритмов моделирования противоэпидемических мероприятий и предоставляет возможность модификации программного кода для реализации дополнительных функций. Она была использована для решения самых разных задач, например, определения оптимальной стратегии тестирования бессимптомных носителей [4], моделирования социркуляции разных геновариантов SARS-CoV-2 [5], эффекта отмены закрытия школ [6] и вероятности «второй волны» [7] в Великобритании, разработки стратегии борьбы с пандемией [8, 9] и вакцинации [10] в Австралии, стратегии вакцинации в США [11] и Италии [12]. При этом в большинстве работ использовалась модель, доработанная с учётом региональных особенностей и конкретных задач.

Цель работы — разработка эпидемиологической агентной модели ПОЭМА (ПОпуляционная

Эпидемиологическая Модель Агентная) на базе платформы Covasim для моделирования эпидемий, изучения влияния различных факторов на распространение возбудителей и оценки эффективности противоэпидемических мероприятий в искусственной популяции. Применение созданного вычислительного инструмента было продемонстрировано в серии цифровых экспериментов в сопоставлении с наблюдаемыми эпидемиологическими закономерностями.

Материалы и методы

В качестве основы для разработки использовали открытый исходный код программы Covasim, выпущенный под допускающей свободное использование лицензией Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 и доступный на сервере GitHub (github.com/institutefordiseasemodeling/covasim). ПОЭМА, как и Covasim, реализована на языках программирования Python и JavaScript.

Моделирование двух и более населённых пунктов с учётом их взаимодействия

Симуляция 2 и более населённых пунктов реализована с применением параллельных вычислений следующим образом: на этапе инициализации в каждом городе создаются дополнительные ячейки для агентов, которые могут прибыть в этот город. Затем каждый город моделируется в отдельном вычислительном потоке. Основная симуляция включает три этапа: добавление агентов, приехавших в город, выполнение основного шага симуляции (один условный день) и выбор агентов, которые покинут город на следующем шаге симуляции. Для каждого перемещённого агента длительность пребывания в другом городе выбирается исходя из распределения Пуассона со средним значением 14 дней (параметр может быть изменён пользователем). У агента, переместившегося на время из одного населённого пункта в другой, остаются только случайные взаимодействия, но их количество возрастает в среднем в 3 раза (коэффициент может быть изменён пользователем). В графический интерфейс добавлена возможность задавать один и более транспортных потоков (перемещение агентов между населёнными пунктами), пользователь указывает исходный пункт и пункт назначения, а также долю ежедневно перемещаемых агентов. Также в графическом интерфейсе реализована возможность просматривать результаты моделирования по отдельным локациям в разных вкладах или сравнить их на общем графике.

Моделирование проведения массовых мероприятий

Симуляция массовых мероприятий реализована следующим образом: пользователь подаёт на вход таблицу (через графический интерфейс или

через вызов функций на языке Python), содержащую для каждого мероприятия день проведения, количество участников и количество таких собраний. Для реализации данного модуля был добавлен новый слой контактов. Этот слой является динамическим, контакты в нём обновляются каждый день для симуляции новых мероприятий. Один агент может участвовать только в одном мероприятии за день.

На первом шаге случайным образом определяется список агентов, которые будут участвовать в массовых мероприятиях. Далее участники разбиваются на группы по отдельным мероприятиям. Для каждой группы строятся случайным образом контакты так, чтобы в среднем у каждого агента было 9 связей, поскольку, по данным литературы, даже для больших массовых мероприятий число контактов с продолжительностью 15 мин и более, при которых возможна передача вируса, в среднем равно 9 [13]. Коэффициент вероятности передачи инфекции при контакте для массовых мероприятий принят равным таковому для рабочих контактов.

Функциональные расширения модели Covasim, реализованные в платформе ПОЭМА

Введены новые варианты распределений восприимчивости агентов к возбудителю и их заразности. Реализован вариант, при котором агенты имеют индивидуальные, но одинаковые для данного агента значения восприимчивости и заразности, с целью моделирования поведения агентов с высокими значениями обоих показателей.

Добавлен учёт задержки по времени между получением положительного результата тестирования и датой передачи информации в органы государственного контроля. Каждому агенту назначается задержка в получении результатов тестирования (случайное число из заданного распределения), которая в ходе симуляции прибавляется к дате проведения теста.

Для учёта социально-демографических особенностей моделируемых регионов РФ реализован дополнительный модуль настройки построения искусственной популяции. Модуль реализован на основе библиотеки с открытым исходным кодом synthpops (доступен по ссылке: <https://github.com/InstituteForDiseaseModeling/synthpops>). В интерфейс была добавлена возможность загрузки параметров исходной популяции в формате таблицы Excel.

Добавлен набор параметров возбудителя, соответствующих варианту Omicron, на основе литературных данных. Совокупность факторов моделирования варианта Omicron вируса SARS-CoV-2 отбирали на основании поиска литературы в базах данных PubMed и Google Scholar по следующим ключевым словам: Omicron transmissibility, transmissibility of Omicron, symptomatic factor, critical factor of Omicron, severe factor of Omicron,

death factor of Omicron and recovery of asymptomatic Omicron. Поиск проводили для статей, опубликованных с 2021 г., были отобраны 45 публикаций, в которых представлены необходимые для стохастической агентной модели параметры. Для расчёта среднего медианного значения этих параметров использовали только те работы, в которых размер выборки был не менее 100 человек.

Вычислительные эксперименты проводили в 2 этапа: сначала с использованием Web-интерфейса оценивали результат при различных сценариях без повторов, затем для оценки вариативности результатов из-за стохастического характера модели наиболее информативные сценарии посредством скрипта на языке Python выполнялись 30 или 100 раз (в разных задачах).

Результаты

Модификации исходного кода Covasim

Создание ПОЭМА было осуществлено на базе открытой среды программирования Covasim с модификацией или добавлением кода в конкретные модули для внедрения новых функций, повышения информативности и локализации (табл. 1).

1. Назначение агентам распределения восприимчивости и заразности

Ключевыми параметрами инфекционного процесса являются восприимчивость субъектов к инфекции (врождённый и приобретённый иммунитет) и контагиозность (заразительность) — возможность передачи возбудителя от субъекта к субъекту. При этом контагиозность считается характеристикой патогена, поскольку на популяционном уровне индивидуальные характеристики субъектов усредняются. В агентной модели имеется возможность задавать индивидуальную способность агента распространять вирус (например, за счёт более высокого уровня репликации вируса, особенностей поведения, выраженности симптомов респираторной инфекции или уменьшения заражающей дозы). Для описания этой характеристики агента (субъекта) далее будет использоваться термин «заразность».

Исходный код Covasim предполагает задание восприимчивости агентов к вирусу, жёстко привязанное к возрасту агента (табл. 2) [14]. При этом авторы Covasim отмечают, что принятые ими характеристики восприимчивости противоречат результатам другого исследования, где восприимчивость к инфекции не менялась с возрастом [15]. В то же время очевидно, что восприимчивость агентов должна соответствовать математическим распределениям, обычно наблюдаемым в биологии, и в других исследованиях изучалось, например, распространение инфекции в популяции при использовании равномерного, гауссова и бимодального гауссова распределений [16].

Таблица 1. Сопоставление Covasim и ПОЭМА

Covasim	ПОЭМА
Восприимчивость агента к возбудителю задана дискретно в зависимости от возрастной категории	Восприимчивость агента к возбудителю задаётся согласно выбранному варианту распределения
Заразность агента задаётся распределением, независимым от восприимчивости агента	Заразность агента может быть задана совместно с восприимчивостью данного агента
Моделирование распространения вариантов SARS-CoV-2 — Уханьский вариант, Alpha, Beta, Gamma, Delta	Введена возможность моделирования инфекции, вызванной вариантом SARS-CoV-2 Omicron; есть возможность создания пользовательского варианта вируса
Моделирование эпидемического распространения происходит в одной синтетической популяции (условном городе), которая создаётся на основании усреднённых европейских демографических и статистических данных	Моделирование эпидемического распространения происходит параллельно для множества синтетических популяций (условных городов) с различными задаваемыми параметрами. Модельные города задаются независимыми друг от друга или связанными коэффициентом взаимодействия. Имеется возможность построения модельных городов на основании реальных демографических и статистических данных
Возможность моделирования противоэпидемических мер — карантин, масочный режим, вакцинация	Добавлена возможность моделирования как разовых (единичных), так и регулярных массовых мероприятий
Противоэпидемические мероприятия вводятся одновременно и с одинаковой интенсивностью во всех учреждениях одного типа условного города	Есть возможность выборочно «закрывать» отдельные школы и предприятия при достижении определённого процента диагностированных случаев (эпидемический порог)
Результаты тестирования агентов отражаются на графике заболеваемости в день тестирования	Результаты тестирования отображаются на графике заболеваемости с задержкой, рассчитанной на основании реальных данных Роспотребнадзора (18 млн записей)
Для настройки требуются базовые навыки программирования	Настройка параметров и расширенные возможности для визуализации в Web-версии

Таблица 2. Коэффициенты восприимчивости возрастных групп населения к вирусу SARS-CoV-2, принятые в исходной версии Covasim [14]

Показатель	Возраст, лет									
	0–9	10–19	20–29	30–39	40–49	50–59	60–69	70–79	80–89	90+
Восприимчивость*, %	0,34	0,67	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,24	1,47	1,47

Примечание. *Коэффициент вероятности заражения при контакте между агентами, используемый в составе формулы, определяющей вероятность передачи вируса при каждом контакте.

Поскольку точные характеристики распределения восприимчивости людей к SARS-CoV-2 и другим респираторным вирусам неизвестны, в модель ПОЭМА была включена возможность применения следующих нормированных распределений:

- распределение восприимчивости с учётом возраста агентов, предложенное в базовой модели Covasim (табл. 2);
- нормальное (без зависимости от возраста);
- логнормальное (без зависимости от возраста);
- логнормальное резкое, с тонким хвостом (без зависимости от возраста).

Для того чтобы обеспечить возможность сравнения влияния распределения восприимчивости на параметры распространения инфекции, сумма условной восприимчивости агентов в популяции (площадь под кривой распределения восприимчивости) в модели ПОЭМА является константой.

В исходном коде Covasim у агента задаётся характеристика восприимчивости (табл. 2), а заразность определяется вероятностью передачи возбудителя. Однако при распространении

COVID-19 описана выраженная гетерогенность по числу заражений от одного больного, когда 80% вторичных заражений были обеспечены 15% больных [17]. Также известно, что вариативность количества вируса SARS-CoV-2 при исследовании методом полимеразной цепной реакции у разных больных (соответственно, и возможность передачи вируса) составлял несколько порядков [18]. В модели ПОЭМА была введена возможность установить прямую зависимость между восприимчивостью субъекта к вирусу и его заразностью либо задавать эти параметры как несвязанные, поскольку в литературе имеются данные в пользу обоих вариантов. Например, способность заражаться и поддерживать высокий уровень репликации теоретически может быть связана с уровнем экспрессии рецептора к вирусу [19]. С другой стороны, показано, что некоторые люди производят значительно больше микрокапель, чем другие, и могут быть более заразны только за счёт этого [20], т. е. восприимчивость и заразность могут быть не связаны между собой на индивидуальном уровне.

2. Введение временной задержки при отражении результатов тестирования

Одним из недостатков базового кода Covasim является мгновенное получение результатов тестирования, проводимых на искусственной популяции агентов. При этом фактическая регистрация данных о тестировании в общей статистике в условиях повышенной нагрузки на систему здравоохранения может происходить со значительной задержкой. Интеграция в модель ПОЭМА реалистичной задержки, максимально приближенной к условиям регистрации заболеваемости в России, выполнена на основании анализа записей более чем 18 млн случаев заболевания COVID-19, для которых сравнивали дату забора положительной пробы и дату поступления информации в Роспотребнадзор. Полученное распределение разницы этих дат для каждого образца было использовано для определения вероятности получения данных с задержкой после проведения тестирования (табл. 3).

3. Внедрение блока формирования двух и более населённых пунктов с их взаимодействием или без взаимодействия

Пандемия COVID-19 продемонстрировала, что введение изоляции определённой территории или населённого пункта не может гарантировать предотвращение распространения возбудителя. Для формирования политики здравоохранения на уровне страны моделирование эпидемии в отдельно взятом регионе без учёта взаимосвязи с другими регионами имеет ограниченную ценность. В исходном коде Covasim реализована опция моделирования притока фиксированного числа заражённых в моделируемую популяцию (каждый день заданное число агентов заболевают без источника заражения), при этом отток инфицированных агентов не предусмотрен. Такой подход не позволяет учитывать динамику развития эпидемии в связанных регионах. Для преодоления этого ограничения была разработана возможность параллельного моделирования нескольких популяций (городов) с независимыми параметрами противоэпидемических мероприятий и возможностью регулировать движение агентов между ними. При отсутствии взаимодействия между городами каждый из них может рассматриваться как независимый эпидемиологический эксперимент, что позволяет сравнивать эффект от особенностей популяции или характера противоэпидемических мероприятий. Коэффициент взаимодействия горо-

дов задаётся эмпирически как процент населения, «перетекающий» между городами каждый день, отражая условные транспортные потоки.

4. Построение модельной искусственной популяции на основании реальных демографических и социологических данных

Моделирование эпидемического процесса в условиях, приближенных к реальным социумам, реализовано в модели ПОЭМА через возможность загрузки демографических и социологических данных конкретного населённого пункта или региона. Данные предоставляются пользователем в виде электронной таблицы, сформированной согласно шаблону, и включают в себя численность населения и его распределение по возрасту, распределение размеров домохозяйств, размеры учебных заведений и количество работающих в них преподавателей и прочих работников, распределение размеров рабочих коллективов и долю занятого населения.

В качестве примера реализации загрузки реальных данных в модели ПОЭМА созданы профили субъектов РФ: Благовещенск и Амурская область, Нижний Новгород и Нижегородская область, Воронеж и Воронежская область.

5. Моделирование распространения варианта Omicron

В конце ноября 2021 г. Всемирная организация здравоохранения определила новый генетический вариант SARS-CoV-2 как вызывающий озабоченность (B.1.1.529) с присвоением названия Omicron [21]. На момент появления у этого варианта SARS-CoV-2 было в несколько раз больше мутаций в шиповидном белке, чем у любого другого варианта [22]. Благодаря этим мутациям вирус варианта Omicron более эффективно связывается с рецепторами ACE2 клетки-хозяина по сравнению с предшествующими вариантами. На Omicron не действуют большинство нейтрализующих антител, вырабатываемых вакцинированными или переболевшими другими вариантами SARS-CoV-2, однако он ассоциируется с более лёгкими симптомами и большей долей бессимптомных носителей по сравнению с другими вариантами [23].

Степень опасности варианта коронавируса зависит от таких факторов, как заразность, уклонение от иммунитета и тяжесть клинического течения инфекции [24]. Базовый репродуктивный показатель (R_0) варианта Omicron составляет 8,2 [25], что соответствует намного более эффективному распро-

Таблица 3. Распределение задержки поступления информации о положительных результатах тестирования в Роспотребнадзор, дни после забора анализа

Показатель	Задержка, дни														
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Доля, %	< 1	14	22	12	10	9	7	6	5	4	3	2	2	2	2

странению по сравнению с более ранними вариантами вируса. В исходной среде Covasim задание трансмиссивности вариантов вируса реализовано на основании коэффициентов относительно исходного Уханьского варианта. В модели ПОЭМА вероятность передачи инфекции от агента к агенту была задана равной 3,34 (относительно Уханьского варианта), рассчитанной как среднее, полученное на основании анализа нескольких публикаций. Вероятность симптоматического течения инфекции при заражении вариантом Omicron была установлена в 0,1 на основании многоцентрового ретроспективного обсервационного исследования, проведённого в Шанхае [26]. Риск госпитализации при инфекции вариантом Omicron был на 56% ниже по сравнению с вариантом Delta [27], а риск тяжёлого течения в 2–3 раза ниже [28]. На основании систематического обзора и метаанализа тяжести и клинических исходов у людей, переболевших вариантом Omicron, был использован коэффициент вероятности критической тяжести заболевания 0,46 по сравнению с вариантом Delta, а коэффициент вероятности летального исхода 0,39. По данным литературы, инкубационный период (в терминологии платформы Covasim, на самом деле латентный период, время от заражения до начала выделения вируса) для варианта Omicron составляет около 2–3 дней, а средняя длительность бессимптомного периода — 2,2 дня [29].

Медианная продолжительность обнаружения вируса составляла 9 дней (от 7 дней у бессимптомных до 10 дней при тяжёлом течении заболевания) [30]. Острые симптомы у инфицированных вариантом

Omicron наблюдались в течение менее длительного периода — в среднем 6,9 дня, чем у пациентов, инфицированных Delta, — в среднем 8,9 дня [24]. Продолжительность пребывания в отделениях интенсивной терапии при заражении вариантом Omicron была на 5 дней меньше, чем при заражении вариантом Delta, среднее медианное значение составило 5,3 дня [31]. Общий уровень летальности был выше для пациентов с вариантом Delta и составил 0,5% по сравнению с пациентами с вариантом Omicron (0,1%). Средний интервал от постановки диагноза до смерти при заражении вариантом Delta составлял 13 дней по сравнению с 10 днями при варианте Omicron [31].

Вычислительные эксперименты

1. Моделирование массовых мероприятий

Массовые мероприятия оказывают значительное влияние на динамику развития эпидемий [32–34] и являются одной из приоритетных мишеней противоэпидемических мероприятий.

Заданы 2 города с населением 100 тыс. жителей с введёнными противоэпидемическими мерами в виде социального дистанцирования (снижение частоты случайных контактов на 50%, контактов в школе и на работе — на 90%). В начальный день в обоих городах 30 человек инфицированы SARS-CoV-2, вариант Delta. Вероятности тестирования бессимптомных и проявляющих симптомы агентов составляли 1 и 10% соответственно. Каждые 10 дней в одном из городов проводятся массовые мероприятия с общим числом участников, равным 20 тыс. Результаты 10 симуляций каждого горо-

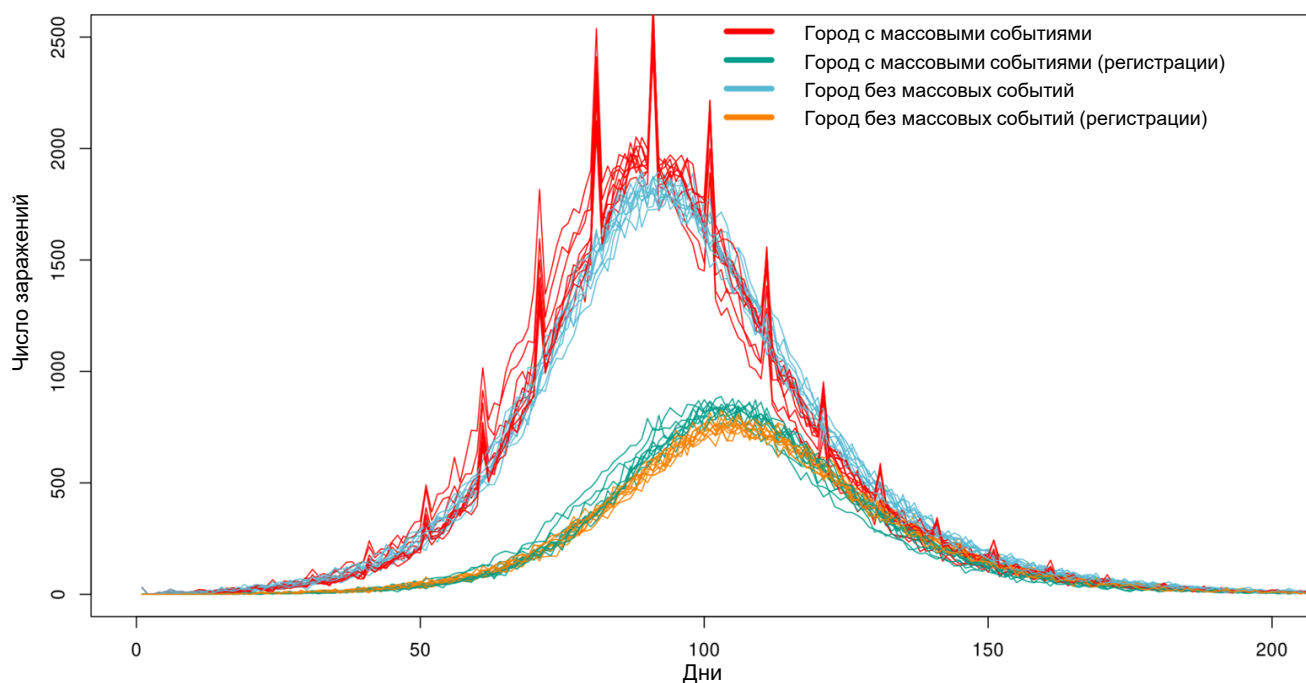


Рис. 1. Влияние проведения массовых мероприятий на число инфицированных SARS-CoV-2 в городе размером 100 тыс. агентов.

да представлены на **рис. 1**. Проведение массовых событий приводит к резкому повышению количества инфицированных в модели. Однако даже значительное количество одномоментно заражённых (500–1000 на фоне 1000–2000 обычно инфицируемых в день) невозможно выявить по результатам ежедневного тестирования из-за сглаживания заболеваемости за счёт разной длительности латентного периода и неравномерной задержки поступления информации о положительных результатах, которая нивелирует резкие подъёмы инфицирования.

2. Моделирование противоэпидемических мероприятий

Наиболее тяжёлое клиническое течение COVID-19 наблюдалось у лиц старшего возраста. Именно на защиту возрастной группы риска были направлены наиболее интенсивные противоэпидемические мероприятия. При этом одной из распространённых мер для снижения заболеваемости было закрытие школ для снижения распространения вируса в обществе и, как следствие, риска внутрисемейного заражения пожилых. Описаны отдельные примеры влияния закрытия школ на снижение заболеваемости пожилых [35], однако в целом эпидемиологические данные не подтверждают эффективность таких мер с достаточной степенью уверенности, а описанные ранее результаты математического моделирования были противоречивыми [36, 37].

На модели ПОЭМА были проверены следующие гипотетические сценарии. Максимально эффективные (100% разобщение всех контактов) меры применялись только к молодым (< 20 лет) или только к пожилым (> 60 лет) на 30–90-й или

60–120-й дни после начала эпидемии (на момент введения мер инфицировано приблизительно 1 или 20% населения соответственно), при этом исходили из того, что административный ресурс позволяет ввести ограничения только на 60 дней.

При раннем введении мер, на фоне низкой распространённости COVID-19, наблюдался выраженный эффект на число инфицированных, однако из-за отмены ограничений на 90-й день, к 140-му дню количество инфицированных во всех группах практически не различалось (**рис. 2**). При этом изоляция и молодых, и, особенно, пожилых привела к снижению числа смертей на 17 и 35% соответственно, однако доверительные интервалы этих результатов частично перекрывались.

При позднем введении мер изоляция молодых привела к снижению числа заболевших на 25%, однако снижение числа летальных исходов было менее выраженным — 16%. Поздняя изоляция пожилых привела к меньшему снижению общей заболеваемости, но к значительному снижению смертности (66%). Таким образом, изоляция молодых может оказать эффект на заболеваемость пожилых, но менее заметный, чем непосредственная изоляция пожилых.

Полученные результаты моделирования согласуются с представлениями о том, что позднее разобщение организованных детских и подростковых коллективов, осуществляемое на фоне роста заболеваемости COVID-19, сопровождается интенсификацией передачи инфекции в домашних очагах за счёт более длительного и тесного бытового контакта (учащиеся, переведённые на заочную форму обучения, инфицируют лиц пенсионного возраста,

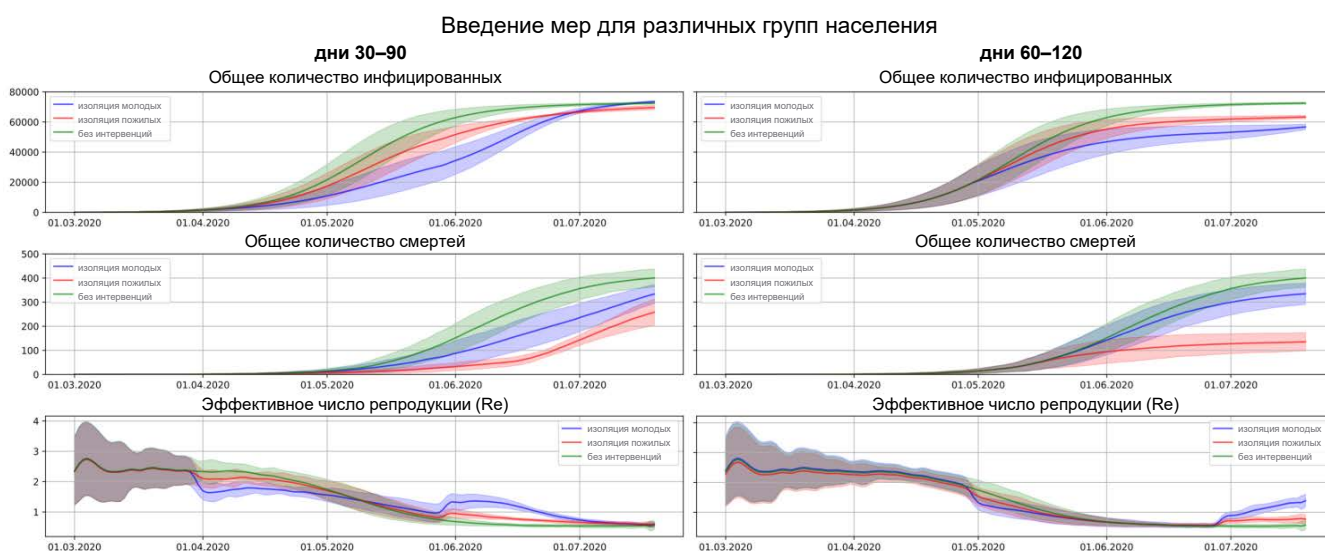


Рис. 2. Влияние введения противоэпидемических мер для разных возрастных групп на заболеваемость и смертность.

Синим на графике отмечены результаты при изоляции молодых индивидов, красным — при изоляции пожилых. Зелёным — моделирование эпидемии в городе без введения мер. Красным и зелёным показано ежедневное число инфицированных и регистрируемые на основании проведения тестирования случаи в городе с массовыми мероприятиями, голубым и жёлтым — число инфицированных и регистрируемые на основании проведения тестирования случаи в городе без массовых мероприятий.

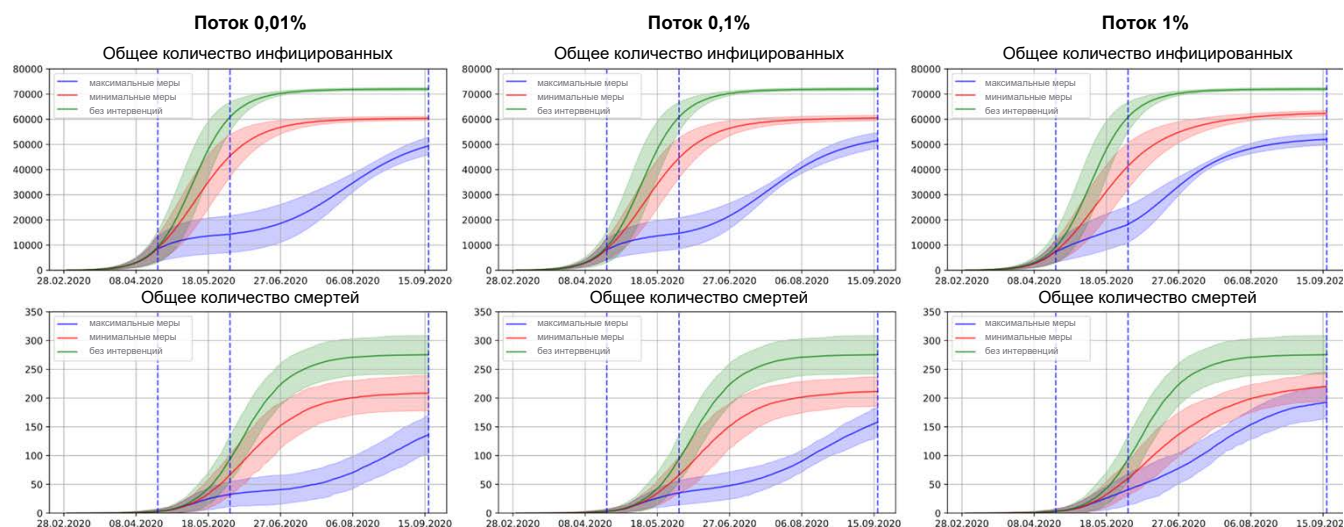


Рис. 3. Влияние транспортных потоков между городами при различном уровне введения противоэпидемических мер на заболеваемость и смертность.

Синим на графике показаны результаты симуляции для города с наибольшей эффективностью мер, красным — для города с мягкими мерами. Зелёным — моделирование эпидемии в городе без введения мер и с отсутствием транспортного сообщения. Пунктирные линии показывают даты введения и отмены мер и завершения симуляции.

которые временно привлекаются к надзору за несовершеннолетними).

3. Моделирование пассажиропотоков

Во время пандемии COVID-19 введение ограничения на передвижение между городами и странами было практически повсеместным и ставило целью предотвратить занос вируса из регионов с неблагоприятной эпидемической обстановкой в области. Для моделирования эффективности блокирования транспортных потоков была выполнена симуляция распространения эпидемии в двух городах. В обоих городах противоэпидемические меры вводили на 50-й день симуляции (мягкие меры в первом городе, жёсткие — во втором). На 90-й день симуляции в обоих городах проводились только мягкие противоэпидемические меры, которые продолжались до окончания моделирования. Мягкие противоэпидемические меры включали только масочный режим на работе и в общественных местах с условной эффективностью 25%, жёсткие меры — масочный режим на работе и в общественных местах с условной эффективностью 75% и закрытие школ. Распространение эпидемии моделировалось при условии минимальных транспортных потоков (0,01% населения ежедневно перемещается между городами), средних (0,1% населения ежедневно, примерно соответствует транспортным потокам между Москвой и Санкт-Петербургом) и интенсивных (1% населения ежедневно).

В городе с мягкими мерами число заболевших к 200-му дню составило 60 тыс. (против 72 тыс. при отсутствии мер), умерших — 210 против 275 (рис. 3). При минимальных транспортных потоках число заболевших в городе с жёсткими мерами к 200-му дню составило 50 тыс., умерших — 130 че-

ловек. При средних транспортных потоках число заболевших в городе с жёсткими мерами практически не изменилось, число умерших выросло до 150 человек. При интенсивных транспортных потоках эффект от жёстких противоэпидемических мер во втором городе был практически нивелирован.

4. Моделирование введения мер при достижении порогового значения случаев

Классическим инструментом в эпидемиологии является введение противоэпидемических мероприятий при достижении заданного уровня (эпидемический порог). Данная методика хорошо отработана для гриппа¹. Поскольку для COVID-19 значения эпидпорога не разработаны, в моделировании были проверены три достаточно строгих значения: 20, 70 и 150 случаев на 10 тыс. населения. При этом было принято, что административный ресурс ограничен, строгие меры (масочный режим с эффективностью 70% в общественных местах и на работе, закрытие школ) вводятся только на 30 дней, затем ещё на 30 — более мягкие (масочный режим с эффективностью 30% в общественных местах, на работе и в школах). Противоэпидемические меры оказали немедленный эффект на эффективность передачи возбудителя в модельной популяции (снижение эффективного репродуктивного числа ниже 1). Суммарное количество инфицированных составляло 30–35 тыс. во всех сценариях, но количество умерших в случае самого позднего введения мер

¹ Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации. 3.1.2. Инфекции дыхательных путей. Методика расчёта эпидемических порогов по гриппу и острым респираторным вирусным инфекциям по субъектам Российской Федерации. Методические рекомендации. МР 3.1.2.0118-17. М.; 2017.

(при достижении суммарного числа диагностированных случаев 150 на 10 тыс. населения) достигло 145, а во всех остальных сценариях значения находилось в диапазоне 91–111 человек (**рис. 4**). Таким образом, модель ПОЭМА позволяет моделировать развитие эпидемии в условиях использования принятых в России стандартов реагирования на распространение заболеваемости, а учёт задержки регистрации, основанный на реальных данных, позволяет планировать борьбу с распространением инфекции с учётом этого фактора.

5. Моделирование циркуляции двух вариантов вируса

Для примера была выбрана Воронежская область, для которой было доступно достаточно большое количество полногеномных сиквенсов вируса SARS-CoV-2 на платформе VGARus в декабре 2021 г. – январе 2022 г., что позволяет сравнить расчётное соотношение вариантов вируса в симуляции и фактически наблюдаемое. В модель были загружены демографические данные и на их основе был создан «цифровой двойник» Воронежской области, в котором 01.04.2021 появились 30 агентов, инфицированных вариантом Delta, а 15.12.2021 — 30 агентов, инфицированных вариантом Omicron.

Данная симуляция была повторена 100 раз, результаты представлены на **рис. 5**. Коэффициент корреляции Пирсона доли варианта Omicron среди циркулирующего в популяции SARS-CoV-2 между средним результатом из 100 симуляций и реальными данными составил 0,9985.

Обсуждение

Вычислительная эпидемиология представляет собой новую область знаний, объединяющую принципы классической эпидемиологии, статистики, математики и информатики для анализа больших массивов данных, моделирования распространения заболеваний в человеческой популяции и обоснования политики общественного здравоохранения.

Успешным примером реализации такого подхода является модель Барояна–Рвачева для предсказания эпидемии гриппа в СССР [38]. В модели использовались подробные данные междугородних миграционных потоков, что позволило прогнозировать моменты старта эпидемического процесса и наступление его пика в столицах союзных республик с высокой точностью.

Быстрое развитие вычислительных технологий в конце XX в. – начале XXI в. позволило перейти к

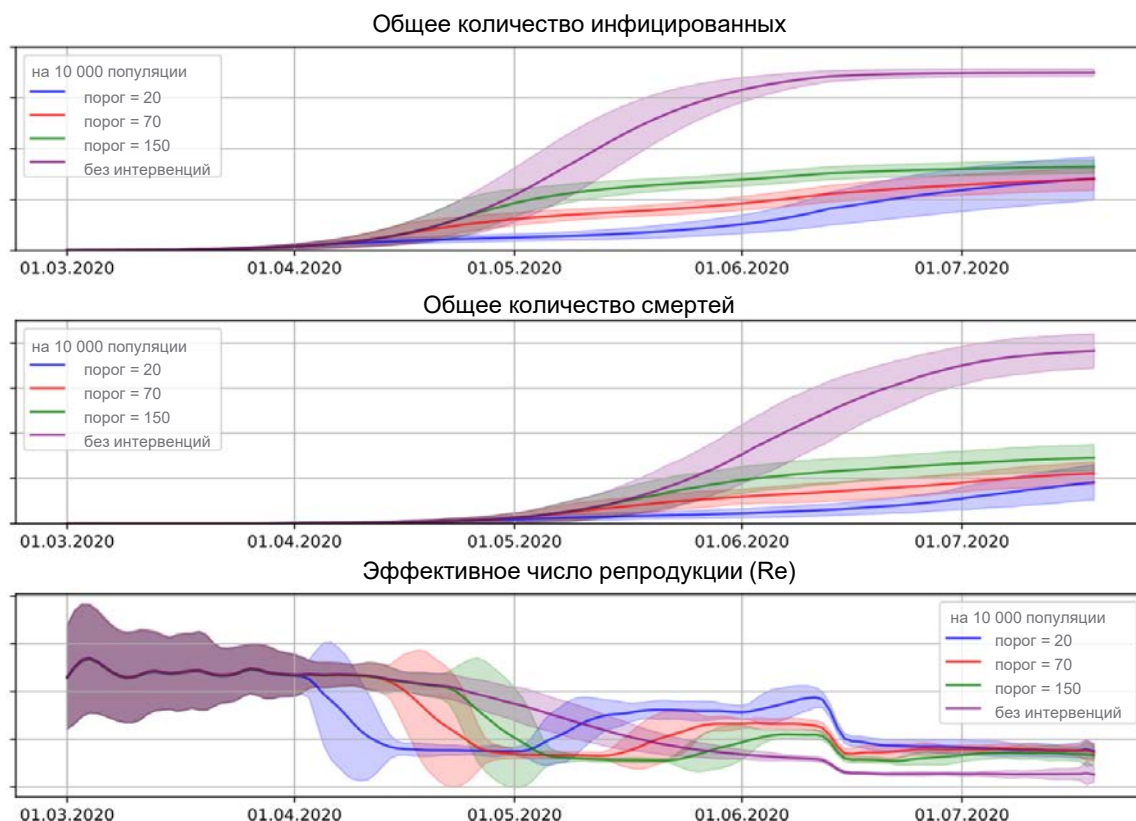


Рис. 4. Влияние введения противоэпидемических мер при достижении порога зарегистрированных случаев на заболеваемость и смертность.

Синим на графике показаны результаты симуляции при введении мер при достижении порога в 20 диагностированных случаев, красным — при достижении порога в 70, зелёным — в 150 диагностированных, фиолетовым — моделирование эпидемии в городе без введения мер.

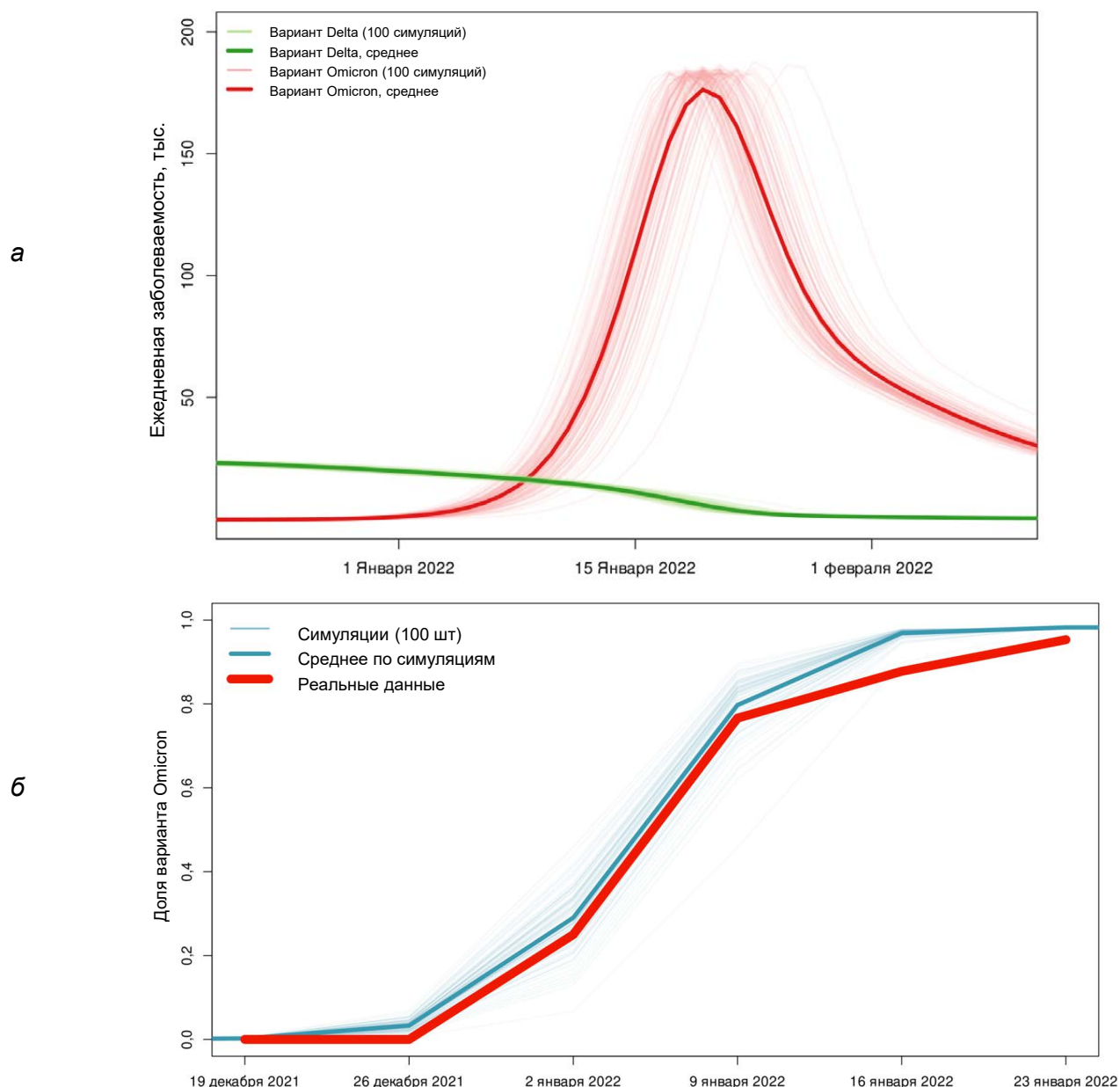


Рис. 5. Симуляция смены доминирующего варианта SARS-CoV-2 в Воронежской области зимой 2021–2022 гг.

а — график ежедневного числа инфицированных с разбивкой по вариантам SARS-CoV-2. Вариант Delta обозначен зелёным цветом, вариант Omicron — красным. Графики ежедневного числа инфицированных в 100 симуляциях отображены бледными цветами, усреднённые значения — яркими.

б — доля варианта Omicron среди циркулирующего в Воронежской области SARS-CoV-2. Вычисленные по результатам 100 симуляций значения отображены бледно-синим цветом, усреднённое значение — тёмно-синим, реальные данные по результатам анализа полногеномных сиквэнсов — красным.

широкомасштабному агентному моделированию с явными взаимодействиями между индивидуумами для симуляции распространения инфекционных болезней. Разработка таких подходов позволяет учитывать целый ряд принципиальных особенностей: разнообразие агентов (например, возраст, пол, социальный статус и т. д.), неоднородность социальных контактов, миграционные потоки, введение мероприятий по контролю распространения заболевания для отдельных групп населения и т. д. Пандемия COVID-19 в полном объёме продемонстриро-

вала необходимость использования предсказательной силы стохастических дискретных моделей для проведения вычислительных эпидемиологических экспериментов по подбору оптимального набора мер реагирования.

Платформа агентного моделирования Covasim, совмещённая с модулем создания синтетической популяции SynthPops, на сегодняшний день является одной из наиболее совершенных в эпидемиологии. За последние 3 года на базе Covasim выполнен большой объём исследований по разработке меро-

приятый для предотвращения распространения эпидемий, например:

- изучение стратегий тестирования и влияния характеристик тестов [4, 9, 39];
- изучение эффективности изоляции и карантина [6, 39];
- моделирование достижения коллективного иммунитета [10];
- анализ стратегий вакцинации [6, 11, 12];
- оценка рисков последствий отмены управленческих решений [8, 40].

В ряде случаев решение поставленных задач достигалось за счёт расширения, калибровки или модификации модели Covasim. Наиболее масштабные дополнения были предложены в новой модели ProMES на основе Covasim [41].

В данной работе представлена модель ПОЭМА, в которой преодолены ограничения, связанные с использованием платформы Covasim для населения разных регионов Российской Федерации и добавлен ряд новых функций, позволяющих проводить вычислительные эксперименты с большей детализацией и достоверностью, чем предусмотрено исходным кодом.

Реализованы профили восприимчивости агентов к SARS-CoV-2, которые отражают накопленные современные данные, отличные от результатов ранних исследований по COVID-19. Внедрена структура популяции на основе реальных демографических данных и корректная задержка регистрации на основе анализа 18 млн случаев COVID-19. Добавлена возможность оценки роли массовых мероприятий и транспортных потоков, на основе метаанализа опубликованных данных добавлена возможность симуляции заболеваемости вариантом Omicron. Web-интерфейс для запуска симуляции и визуализации результатов делает возможным работу с платформой ПОЭМА для пользователей без навыков программирования. Для научных исследований существует возможность множественных повторов симуляции с оценкой статистической значимости и выдачей результатов не только в графическом формате, но и в виде исходных значений всех параметров.

Выполненные для демонстрации возможностей модели цифровые эпидемиологические эксперименты показывают соответствие модели реально наблюдаемому развитию эпидемий и эффекту от противоэпидемических мероприятий. При этом на модели возможно отработать не только стандартные сценарии, но и экстремальные, такие как появление высоко контагиозных патогенов. Поскольку в течение пандемии COVID-19 ключевым ограничением стало принятие ограничений обществом, с использованием платформы ПОЭМА возможно подобрать максимально эффективные меры с учётом ограниченного административного ресурса. Модель Covasim была разработана с упором на

производительность, простоту использования и гибкость: реалистичные сценарии можно запустить на стандартном ноутбуке менее чем за минуту [3]. В системе ПОЭМА моделирование эпидемии в популяции размером 100 тыс. человек в течение 180 дней и создание всех графиков выполняется за 30 с на системе с одним вычислительным ядром. Моделирование популяции в 1 млн человек в течение 180 дней занимает 6 мин.

Ограничением платформы ПОЭМА является отсутствие функций предсказания развития эпидемии. Существуют исследования, где такая возможность реализована за счёт динамической подстройки эффективности передачи вируса с учётом текущих данных о заболеваемости. Этот подход может быть достаточно эффективным для предсказания заболеваемости на короткий срок (порядка 2 нед), однако в данной работе приоритетной целью было максимально подробное воспроизведение популяции и распространения эпидемии для разработки стратегий противоэпидемических мероприятий. Динамическая подстройка модели является лёгким способом компенсировать несовершенство модели, однако может снизить её ценность как инструмента планирования.

Заключение

ПОЭМА — первая в России платформа для агентного моделирования эпидемий, в перспективе доступная широкому кругу профессиональных эпидемиологов. Гибкость модели позволяет практически неограниченно масштабировать платформу за счёт добавления регионов и транспортных потоков на основе демографических и статистических данных, задания новых вариантов коронавируса и других патогенов. Модель реализована полностью в российском контуре на сервере НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора и может быть использована для проведения цифровых эпидемиологических экспериментов с целью прогноза эффективности противоэпидемических мероприятий в Российской Федерации.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Маслова И.И., Манолов А.И., Глушченко О.Е. и др. Ограничения в создании искусственных популяций в агентном моделировании эпидемий: систематический обзор. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2024;101(4):530–45. Maslova I.I., Manolov A.I., Glushchenko O.E., et al. Limitations in creating artificial populations in agent-based epidemic modeling: a systematic review. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2024;101(4):530–45. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-467> EDN: <https://elibrary.ru/goxztx>
2. Grefenstette J.J., Brown S.T., Rosenfeld R., et al. FRED (a Framework for Reconstructing Epidemic Dynamics): an open-source software system for modeling infectious diseases and control strategies using census-based populations. *BMC*

- Public Health*. 2013;13(1):940.
DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2458-13-940>
3. Kerr C.C., Stuart R.M., Mistry D., et al. Covasim: an agent-based model of COVID-19 dynamics and interventions. *PLoS Comput. Biol.* 2021;17(7):e1009149.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009149>
 4. Silva M.E.P., Fyles M., Pi L., et al. The role of regular asymptomatic testing in reducing the impact of a COVID-19 wave. *Epidemics*. 2023;44(100699):100699.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.epidem.2023.100699>
 5. Panovska-Griffiths J., Swallow B., Hinch R., et al. Statistical and agent-based modelling of the transmissibility of different SARS-CoV-2 variants in England and impact of different interventions. *Philos. Trans. A Math. Phys. Eng. Sci.* 2022;380(2233):20210315.
DOI: <https://doi.org/10.1098/rsta.2021.0315>
 6. Panovska-Griffiths J., Stuart R.M., Kerr C.C., et al. Modelling the impact of reopening schools in the UK in early 2021 in the presence of the alpha variant and with roll-out of vaccination against SARS-CoV-2. *J. Math. Anal. Appl.* 2022;514(2):126050.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmaa.2022.126050>
 7. Panovska-Griffiths J., Kerr C.C., Stuart R.M., et al. Determining the optimal strategy for reopening schools, the impact of test and trace interventions, and the risk of occurrence of a second COVID-19 epidemic wave in the UK: a modelling study. *Lancet Child Adolesc. Health*. 2020;4(11):817–27.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S2352-4642\(20\)30250-9](https://doi.org/10.1016/S2352-4642(20)30250-9)
 8. Scott N., Abeyesuriya R.G., Delpont D., et al. COVID-19 epidemic modelling for policy decision support in Victoria, Australia 2020–2021. *BMC Public Health*. 2023;23(1):988.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s12889-023-15936-w>
 9. Sanz-Leon P., Stevenson N.J., Stuart R.M., et al. Risk of sustained SARS-CoV-2 transmission in Queensland, Australia. *Sci. Rep.* 2022;12(1):6309.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10349-y>
 10. Sanz-Leon P., Hamilton L.H.W., Raison S.J., et al. Modelling herd immunity requirements in Queensland: impact of vaccination effectiveness, hesitancy and variants of SARS-CoV-2. *Philos. Trans. A Math. Phys. Eng. Sci.* 2022;380(2233):20210311.
DOI: <https://doi.org/10.1098/rsta.2021.0311>
 11. Li J., Giabbanelli P. Returning to a normal life via COVID-19 vaccines in the United States: a large-scale agent-based simulation study. *JMIR Med. Inform.* 2021;9(4):e27419.
DOI: <https://doi.org/10.2196/27419>
 12. Cattaneo A., Vitali A., Mazzoleni M., Previdi F. An agent-based model to assess large-scale COVID-19 vaccination campaigns for the Italian territory: the case study of Lombardy region. *Comput. Methods Programs Biomed.* 2022;224(107029):107029.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2022.107029>
 13. Moritz S., Gottschick C., Horn J., et al. The risk of indoor sports and culture events for the transmission of COVID-19. *Nat. Commun.* 2021;12(1):5096.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25317-9>
 14. Zhang J., Litvinova M., Liang Y., et al. Changes in contact patterns shape the dynamics of the COVID-19 outbreak in China. *Science*. 2020;368(6498):1481–6.
DOI: <https://doi.org/10.1126/science.abb8001>
 15. Bi Q., Wu Y., Mei S., et al. Epidemiology and transmission of COVID-19 in 391 cases and 1286 of their close contacts in Shenzhen, China: a retrospective cohort study. *Lancet Infect. Dis.* 2020;20(8):911–9.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30287-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30287-5)
 16. Mukherjee S., Mondal S., Bagchi B. Stochastic formulation of multiwave pandemic: decomposition of growth into inherent susceptibility and external infectivity distributions. *J. Chem. Sci (Bangalore)*. 2021;133(4):118.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s12039-021-01981-8>
 17. Sun K., Wang W., Gao L., et al. Transmission heterogeneities, kinetics, and controllability of SARS-CoV-2. *Science*. 2021;371(6526):eabe2424.
DOI: <https://doi.org/10.1126/science.abe2424>
 18. To K.K.W., Tsang O.T.Y., Leung W.S., et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect. Dis.* 2020;20(5):565–74.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30196-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30196-1)
 19. Devaux C.A., Rolain J.M., Raoult D. ACE2 receptor polymorphism: susceptibility to SARS-CoV-2, hypertension, multi-organ failure, and COVID-19 disease outcome. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2020;53(3):425–35.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.04.015>
 20. Edwards D.A., Ausiello D., Salzman J., et al. Exhaled aerosol increases with COVID-19 infection, age, and obesity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2021;118(8):e2021830118.
DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.2021830118>
 21. Willett B.J., Grove J., MacLean O.A., et al. SARS-CoV-2 Omicron is an immune escape variant with an altered cell entry pathway. *Nat. Microbiol.* 2022;7(8):1161–79.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01143-7>
 22. Callaway E. Heavily mutated Omicron variant puts scientists on alert. *Nature*. 2021;600(7887):21.
DOI: <https://doi.org/10.1038/d41586-021-03552-w>
 23. Barut G.T., Halwe N.J., Taddeo A., et al. The spike gene is a major determinant for the SARS-CoV-2 Omicron-BA.1 phenotype. *Nat. Commun.* 2022;13(1):5929.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33632-y>
 24. Zhang H., Huang C., Gu X., et al. 3-year outcomes of discharged survivors of COVID-19 following the SARS-CoV-2 omicron (B.1.1.529) wave in 2022 in China: a longitudinal cohort study. *Lancet Respir. Med.* 2024;12(1):55–66.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(23\)00387-9](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(23)00387-9)
 25. Liu Y., Rocklöv J. The effective reproductive number of the Omicron variant of SARS-CoV-2 is several times relative to Delta. *J. Travel Med.* 2022;29(3):taac037.
DOI: <https://doi.org/10.1093/jtm/taac037>
 26. Chen Z., Deng X., Fang L., et al. Epidemiological characteristics and transmission dynamics of the outbreak caused by the SARS-CoV-2 Omicron variant in Shanghai, China: a descriptive study. *Lancet Reg. Health West Pac.* 2022;29(100592):100592.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lanwpc.2022.100592>
 27. Zheng Y., Zhang H., Weng Z., et al. Clinical characteristics and predictors of delayed discharge among children with SARS-CoV-2 Omicron variant infection. *Biomed. Rep.* 2024;20(2):29.
DOI: <https://doi.org/10.3892/br.2023.1717>
 28. Zhang W., Wu H., Guo Q., et al. Association of clinical characteristics and vaccines with risk of persistently viral clearance in patients infected with SARS-CoV-2 Omicron variant in Shanghai, China. *Heliyon*. 2024;10(1):e23256.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e23256>
 29. Сизикова Т.Е., Чухраля О.В., Лебедев В.Н., Борисевич С.В. Вариант омикрон вируса SARS-CoV-2: способность вызывать заболевание у лиц, имеющих иммунитет против COVID-19, сформированный в результате вакцинации или ранее перенесенного заболевания. *Вестник войск ПХБ защиты*. 2023;6(1):44–55. Sizikova T.E., Chuhralya O.V., Lebedev V.N., Borisevich S.V. The omicron variant of SARS-CoV-2 virus: The ability to cause disease in persons with immunity against COVID-19. *Journal of NBC Protection Corps*. 2023;6(1):44–55.
DOI: <https://doi.org/10.35825/2587-5728-2022-6-1-44-55>
EDN: <https://elibrary.ru/jfxeeb>
 30. Li Y., Jiang X., Qiu Y., et al. Latent and incubation periods of Delta, BA.1, and BA.2 variant cases and associated factors: a cross-sectional study in China. *BMC Infect. Dis.* 2024;24(1):294.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-024-09158-7>
 31. Zhang L., Kang X., Wang L., et al. Clinical and virological features of asymptomatic and mild symptomatic patients with

- SARS-CoV-2 Omicron infection at Shanghai Fangcang shelter hospital. *Immun. Inflamm. Dis.* 2023;11(9):e1033.
DOI: <https://doi.org/10.1002/uid3.1033>
32. Che Mat N.F., Edinur H.A., Abdul Razab M.K.A., Safuan S. A single mass gathering resulted in massive transmission of COVID-19 infections in Malaysia with further international spread. *J. Travel. Med.* 2020;27(3):taaa059.
DOI: <https://doi.org/10.1093/jtm/taaa059>
 33. Memish Z.A., Steffen R., White P., et al. Mass gatherings medicine: public health issues arising from mass gathering religious and sporting events. *Lancet.* 2019;393(10185):2073–84. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30501-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30501-X)
 34. Hoang V.T., Gautret P. Infectious diseases and mass gatherings. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 2018;20(11):44.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s11908-018-0650-9>
 35. Chung P.C., Chen K.J., Chang H.M., Chan T.C. Evaluating the effectiveness of school closure in COVID-19-related syndromes from community-based syndromic surveillance: longitudinal observational study. *Interact. J. Med. Res.* 2023;12:e44606.
DOI: <https://doi.org/10.2196/44606>
 36. Viner R.M., Russell S.J., Croker H., et al. School closure and management practices during coronavirus outbreaks including COVID-19: a rapid systematic review. *Lancet Child Adolesc. Health.* 2020;4(5):397–404.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S2352-4642\(20\)30095-X](https://doi.org/10.1016/S2352-4642(20)30095-X)
 37. Hume S., Brown S.R., Mahtani K.R. School closures during COVID-19: an overview of systematic reviews. *BMJ Evid. Based. Med.* 2023;28(3):164–74.
DOI: <https://doi.org/10.1136/bmjebm-2022-112085>
 38. Бароян О.В., Рвачев Л.А. *Математика и эпидемиология*. М.;1977. Baroyan O.V., Rvachev L.A. *Mathematics and Epidemiology*. Moscow;1977.
 39. Kerr C.C., Mistry D., Stuart R.M., et al. Controlling COVID-19 via test-trace-quarantine. *Nat. Commun.* 2021;12(1):2993.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23276-9>
 40. Scott N., Palmer A., Delport D., et al. Modelling the impact of relaxing COVID-19 control measures during a period of low viral transmission. *Med. J. Aust.* 2021;214(2):79–83.
DOI: <https://doi.org/10.5694/mja2.50845>
 41. Latkowski R., Dunin-Kępcicz B. An agent-based COVID-19 simulator: extending Covasim to the Polish context. *Procedia Comput. Sci.* 2021;192:3607–16.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procs.2021.09.134>

Информация об авторах

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

Аюпова Асия Фаязовна — н. с. лаб. молекулярной эпидемиологии возникающих инфекций НИИ системной биологии и медицины, Москва, Россия, asiya.bun@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7038-3911>

Говорун Вадим Маркович — д-р биол. наук, профессор, академик РАН, директор НИИ системной биологии и медицины, Москва, Россия, govorun@sysbiomed.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0837-8764>

Горбачёва Алина Антоновна — н. с. лаб. молекулярной эпидемиологии возникающих инфекций НИИ системной биологии и медицины, Москва, Россия, mantodea13@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0009-7750-370X>

Ильина Елена Николаевна — д-р биол. наук, член-корр. РАН, г. н. с., зав. лаб. математической биологии и биоинформатики НИИ системной биологии и медицины, Москва, Россия, ilinaen@sysbiomed.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0130-5079>

Качалов Вячеслав Николаевич — с. н. с. лаб. математической биологии и биоинформатики НИИ системной биологии и медицины, Москва, Россия; доцент Московского физико-технического института (национального исследовательского университета), Долгопрудный, Россия, kachalov_vn@sysbiomed.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0310-3764>

Козлов Иван Евгеньевич — лаборант-исследователь лаб. математической биологии и биоинформатики НИИ системной биологии и медицины, Москва, Россия, ivan.kozloff98@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0007-2437-5527>

Клочков Константин Александрович — м. н. с. лаб. математической биологии и биоинформатики НИИ системной биологии и медицины, Москва, Россия; студент Московского физико-технического института (национального исследовательского университета), Долгопрудный, Россия, konstantin.a.klochkov@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0008-2839-6189>

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

Лукашев Александр Николаевич — д-р биол. наук, член-корр. РАН, г. н. с. НИИ системной биологии и медицины, Москва, Россия; директор Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского

Information about the authors

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

Asiya F. Ayupova — researcher, Laboratory of molecular epidemiology of emerging infections, Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow, Russia, asiya.bun@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7038-3911>

Vadim M. Govorun — Dr Sci. (Biol.), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Director, Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow, Russia, govorun@sysbiomed.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0837-8764>

Alina A. Gorbacheva — researcher, Laboratory of molecular epidemiology of emerging infections, Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow, Russia, mantodea13@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0009-7750-370X>

Elena N. Ilina — Dr Sci. (Biol.), Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, main researcher, Head, Laboratory of mathematical biology and bioinformatics, Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow, Russia, ilinaen@sysbiomed.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0130-5079>

Viacheslav N. Kachalov — senior researcher, Laboratory of mathematical biology and bioinformatics, Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow, Russia; Associate Professor, Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny, Russia, kachalov_vn@sysbiomed.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0310-3764>

Ivan E. Kozlov — assistant researcher, Laboratory of mathematical biology and bioinformatics, Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow, Russia, ivan.kozloff98@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0007-2437-5527>

Konstantin A. Klochkov — junior researcher, Laboratory of mathematical biology and bioinformatics, Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow, Russia; student, Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny, Russia, konstantin.a.klochkov@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0008-2839-6189>

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

Alexander N. Lukashev — Dr Sci. (Biol.), Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, main researcher, principal researcher, Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow, Russia; Director, E.I. Marcinovsky Institute of Medical

Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, Москва, Россия, alexander_lukashev@hotmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7365-0352>

Манолов Александр Иванович — канд. биол. наук, н. с. НИИ системной биологии и медицины, Москва, Россия, paraslonic@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-3912-429X>

Маслова Ирина Ильинична — м. н. с. лаб. математической биологии и биоинформатики НИИ системной биологии и медицины, Москва, Россия, maslova1ira@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0000-0849-9123>

Самойлов Андрей Евгеньевич — н. с. лаб. математической биологии и биоинформатики НИИ системной биологии и медицины, Москва, Россия, samoilov_ae@sysbiomed.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8284-3164>

Сафронов Валентин Алексеевич — в. н. с. Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, safronov64@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-9563-2833>

Цуркис Вера Ильинична — м. н. с. лаб. математической биологии и биоинформатики НИИ системной биологии и медицины, Москва, Россия, veratsurkis21@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0001-5140-0990>

Участие авторов: *Попова А.Ю., Говорун В.М., Кутырев В.В.* — общее руководство, курирование проекта; *Аюпова А.Ф.* — отбор и анализ научных публикаций, составление текста рукописи; *Горбачёва А.А.* — внесение изменений в код модели, анализ научных публикаций; *Ильина Е.Н.* — формулирование и развитие ключевых целей и задач, критический пересмотр рукописи, написание замечаний и редактирование; *Качалов В.Н., Козлов И.Е.* — внесение изменений в код модели, анализ научных публикаций с точки зрения программного обеспечения; *Клочков К.А., Цуркис В.И.* — изучение и анализ модели; *Лукашев А.Н.* — критический пересмотр рукописи, развитие ключевых целей и задач, написание замечаний и редактирование; *Манолов А.И.* — критический пересмотр рукописи, проверка результатов исследования, написание замечаний и редактирование; *Маслова И.И.* — отбор и анализ научных публикаций, составление текста рукописи, проведение экспериментов; *Самойлов А.Е.* — отбор и анализ научных публикаций, создание текста рукописи, проведение экспериментов; *Сафронов В.А.* — научное консультирование по вопросам эпидемиологии.

Статья поступила в редакцию 29.08.2025;
принята к публикации 25.10.2025;
опубликована 31.10.2025

Parasitology, Tropical and Vector-Borne Diseases of the I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia, alexander_lukashev@hotmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7365-0352>

Alexander I. Manolov — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow, Russia, paraslonic@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-3912-429X>

Irina I. Maslova — junior researcher, Laboratory of mathematical biology and bioinformatics, Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow, Russia, maslova1ira@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0000-0849-9123>

Andrei E. Samoilov — researcher, Laboratory of mathematical biology and bioinformatics, Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow, Russia, samoilov_ae@sysbiomed.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8284-3164>

Valentin A. Safronov — leading researcher, Russian Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, safronov64@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-9563-2833>

Vera I. Tsurkis — junior researcher, Laboratory of mathematical biology and bioinformatics, Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow, Russia, veratsurkis21@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0001-5140-0990>

Authors' contribution: *Popova A.Yu., Govorun V.M., Kutyrev V.V.* — general management, project supervision; *Ayupova A.F.* — selection and analysis of scientific publications, drafting of the manuscript text; *Gorbacheva A.A.* — making changes to the model code, analysis of scientific publications; *Irina E.N.* — formulation and development of key objectives and tasks, critical revision of the manuscript, writing comments and editing; *Kachalov V.N., Kozlov I.E.* — making changes to the model code, analyzing scientific publications from the software point of view; *Klochkov K.A., Tsurkis V.I.* — studying and analyzing the model; *Lukashev A.N.* — critical revision of the manuscript, development of key goals and objectives, writing comments and editing; *Manolov A.I.* — critical revision of the manuscript, verification of research results, writing comments and editing; *Maslova I.I.* — selection and analysis of scientific publications, drafting the text of the manuscript, conducting experiments; *Samoilov A.E.* — selection and analysis of scientific publications, creation of the text of the manuscript, conducting experiments; *Safronov V.A.* — scientific consulting on epidemiology.

The article was submitted 29.08.2025;
accepted for publication 25.10.2025;
published 31.10.2025

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-742>



Ассоциация полиморфных вариантов гена *TRIM22* (*N155D* и *T242R*) с ВИЧ-инфекцией в Северо-Западном федеральном округе России

Останкова Ю.В.[✉], Давыденко В.С., Щемелев А.Н., Тотолян А.А.

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

Аннотация

Введение. Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) остается глобальной проблемой здравоохранения. Ген *TRIM22*, кодирующий белок с противовирусной активностью, является перспективным кандидатом для исследований, однако его роль в патогенезе ВИЧ-инфекции в популяциях Российской Федерации ранее не изучалась.

Целью работы был анализ полиморфных вариантов rs7935564 (*N155D*) и rs1063303 (*T242R*) гена *TRIM22* у ВИЧ-инфицированных лиц в Северо-Западном федеральном округе.

Материалы и методы. Проведён анализ полиморфных вариантов rs7935564 (*N155D*) и rs1063303 (*T242R*) гена *TRIM22* в группах ВИЧ-инфицированных лиц с вирусологической неэффективностью антиретровирусной терапии ($n = 378$) и практически здоровых лиц ($n = 319$). Генотипирование выполнено методом полимеразной цепной реакции с последующим секвенированием. Статистический анализ включал проверку соответствия распределения генотипов равновесию Харди–Вайнберга, оценку ассоциаций по 3 моделям наследования (доминантной, рецессивной, аддитивной) с расчётом отношения шансов (ОШ) и 95% доверительного интервала (ДИ), анализ неравновесия сцепления и частот гаплотипов.

Результаты. Распределение генотипов для анализируемых полиморфных вариантов соответствовало равновесию Харди–Вайнберга ($p > 0,05$). Выявлена достоверная ассоциация аллеля G полиморфизма rs7935564 с наличием ВИЧ-инфекции в рецессивной (ОШ = 1,76) и аддитивной (ОШ = 1,37) моделях наследования. Для полиморфизма rs1063303 значимая ассоциация наблюдалась только в доминантной модели (ОШ = 1,40). Обнаружено умеренное неравновесие сцепления между локусами ($D' = 0,4478$; $r^2 = 0,1572$; $p < 0,001$). Гаплотип G-G (rs7935564_G — rs1063303_G) был ассоциирован с наличием инфекции (ОШ = 1,57).

Заключение. В российской популяции полиморфный вариант rs7935564 (*N155D*) гена *TRIM22* является значимым генетическим фактором ассоциации с ВИЧ-инфекцией, в то время как для rs1063303 (*T242R*) получены статистически неоднозначные результаты. Ассоциация гаплотипа G-G с наличием инфекции свидетельствует о потенциальном синергетическом эффекте данных аллелей. Полученные данные подчёркивают важность учёта популяционной специфики при оценке генетических детерминант взаимодействия ВИЧ и организма-хозяина.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, взаимодействие вирус–хозяин, *TRIM22*, полиморфизм, прогностические маркеры, лабораторная диагностика

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Санкт-Петербургского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (протокол № 110/а от 27.11.2020).

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: Останкова Ю.В., Давыденко В.С., Щемелев А.Н., Тотолян А.А. Ассоциация полиморфных вариантов гена *TRIM22* (*N155D* и *T242R*) с ВИЧ-инфекцией в Северо-Западном федеральном округе России. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2025;102(5):530–538.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-742>

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

Association of *TRIM22* gene polymorphisms (*N155D* and *T242R*) with HIV infection in the Northwestern Federal District of Russia

Yulia V. Ostankova[✉], Vladimir S. Davydenko, Alexander N. Schemelev, Areg A. Totolian

Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg Russia

Abstract

Introduction. The human immunodeficiency virus (HIV) remains a global health challenge. The *TRIM22* gene, which encodes a protein with antiviral activity, is a promising candidate for research, but its role in the pathogenesis of HIV infection in population of the Russian Federation has not been previously studied.

The aim of the study was to analyze the polymorphic variants rs7935564 (*N155D*) and rs1063303 (*T242R*) of the *TRIM22* gene in HIV-infected individuals in the Northwestern Federal District.

Materials and methods. Polymorphic variants rs7935564 (*N155D*) and rs1063303 (*T242R*) of the *TRIM22* gene were analyzed in groups of HIV-infected individuals with virological failure of antiretroviral therapy ($n = 378$) and practically healthy individuals ($n = 319$). Genotyping was performed using the polymerase chain reaction method followed by sequencing. Statistical analysis included testing for Hardy-Weinberg equilibrium of genotype distributions, assessing associations under 3 inheritance models (dominant, recessive, additive) with odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) calculation, linkage disequilibrium analysis, and haplotype frequency analysis.

Results. The distribution of genotypes for the analyzed polymorphic variants was conformed to Hardy-Weinberg equilibrium expectations ($p > 0.05$). A significant association was found between the G allele of the rs7935564 polymorphism and the presence of HIV infection in both recessive (OR = 1.76) and additive (OR = 1.37) inheritance models. For polymorphism rs1063303, a significant association was observed only in the dominant model (OR = 1.40). Moderate linkage disequilibrium was found between the loci ($D' = 0.4478$; $r^2 = 0.1572$; $p < 0.001$). The G-G haplotype (rs7935564_G — rs1063303_G) was associated with the presence of infection (OR = 1.57).

Conclusion. In the Russian population, the polymorphic variant rs7935564 (*N155D*) of the *TRIM22* gene is a significant genetic factor associated with HIV infection, while the results for rs1063303 (*T242R*) were statistically ambiguous. The association of the G-G haplotype with the presence of infection suggests a potential synergistic effect of these alleles. The data obtained highlight the importance of considering a population genetic background when evaluating the genetic determinants of the interaction between HIV and the host organism.

Keywords: HIV infection, virus-host interaction, *TRIM22*, polymorphism, prognostic markers, laboratory diagnostics

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Saint-Petersburg Pasteur Institute (protocol No. 110/a, November 27, 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: Ostankova Yu.V., Davydenko V.S., Schemelev A.N., Totolian A.A. Association of *TRIM22* gene polymorphisms (*N155D* and *T242R*) with HIV infection in the Northwestern Federal District of Russia. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(5):530–538.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-742>

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

Введение

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) продолжает оставаться одной из наиболее значимых глобальных проблем общественного здравоохранения. По последним эпидемиологическим данным¹, в 2024 г. более 40 млн человек живут с этой инфекцией. Несмотря на впечатляющие успехи в разра-

ботке антиретровирусной терапии (АРТ), которая позволила трансформировать инфекцию из смертельного приговора в контролируемое хроническое заболевание, полная эрадикация вируса из организма остается недостижимой целью [1]. Одним из ключевых препятствий на этом пути является высокая генетическая изменчивость вируса и сложный характер его взаимодействия с иммунной системой хозяина [2]. Важнейшим компонентом врождённого иммунитета против вирусных инфекций являются интерферон-стимулированные гены, продукты ко-

¹ Global HIV & AIDS statistics — Fact sheet / UNAIDS 2024 epidemiological estimates. URL: <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet> (дата обращения: 14.08.2025).

торых формируют многокомпонентную противовирусную систему [3]. В последние годы всё большее внимание среди этих компонентов уделяется роли клеточных факторов рестрикции, которые представляют собой эволюционно древнюю первую линию защиты против патогенов [4]. Эти конститутивно экспрессируемые белки способны распознавать и напрямую ингибировать репликацию вируса на ранних этапах его жизненного цикла, до запуска адаптивного иммунного ответа.

Среди многочисленных факторов врождённого иммунитета особый интерес представляет семейство TRIM (Tripartite Motif), объединяющее белки, которые обладают Е3-убиквитинлигазной активностью и участвуют в разнообразных клеточных процессах, включая пролиферацию, апоптоз, аутофагию и противовирусную защиту [5, 6]. Ключевым механизмом их действия является опосредованная убиквитинизацией деградация вирусных компонентов или активация сигнальных путей, ведущих к синтезу интерферонов I типа и провоспалительных цитокинов [7, 8]. Представители этого семейства, такие как TRIM5α, хорошо известны своей способностью подавлять ретровирусы, включая ВИЧ, путём специфического связывания с вирусным капсидом и его преждевременной дестабилизации [9]. Однако другой член этого семейства, TRIM22, локализованный на хромосоме 11 в кластере с другими генами семейства TRIM, привлекает всё большее внимание как мощный регулятор противовирусного ответа, хотя его роль при ВИЧ-инфекции изучена в значительно меньшей степени и остаётся противоречивой [10]. Показано, что TRIM22 способен подавлять репликацию широкого спектра вирусов, однако данные о функции указанного белка относительно ВИЧ носят сложный и зачастую двойственный характер. Ряд исследований демонстрируют его прямую противовирусную активность. Так, установлено, что TRIM22 может ингибировать транскрипцию ВИЧ-1, подавляя активность его длинных концевых повторов (LTR), а также нарушать процессинг и сборку вирионов через взаимодействие с белком-предшественником Gag [12]. Более того, экспрессия TRIM22 негативно коррелирует с вирусной нагрузкой у пациентов, а его сверхэкспрессия *in vitro* приводит к эффективному подавлению репликации ВИЧ-1 [11, 12]. Эти данные позволяют рассматривать TRIM22 как важный компонент клеточной защиты против ВИЧ. С другой стороны, есть свидетельства о потенциально провирусной роли TRIM22 в определённых контекстах. Некоторые работы указывают на то, что TRIM22 может усиливать провоспалительный ответ через активацию NF-κB, что теоретически может способствовать хронической иммунной активации и прогрессированию заболевания [13]. Кроме того, есть предположения, что в зависимости от

клеточного типа и фазы инфекции TRIM22 может оказывать разнонаправленные эффекты, выступая либо как фактор рестрикции, либо как модулятор иммунного ответа, непрямым образом влияющий на персистенцию вируса [14]. Эта неоднозначность подчёркивает сложность функционирования иммунной системы хозяина и необходимость дальнейших исследований для раскрытия точной роли TRIM22 при ВИЧ-инфекции.

Важным аспектом, определяющим функциональную активность белков семейства TRIM, является их генетический полиморфизм. Однонуклеотидные полиморфные варианты (single nucleotide polymorphism, SNP) в кодирующих и регуляторных областях гена *TRIM22* могут влиять на уровень его экспрессии, стабильность белка или функциональность, тем самым модулируя индивидуальную восприимчивость к инфекции и скорость прогрессирования заболевания. Однако результаты исследований связи полиморфизма *TRIM22* с ВИЧ-инфекцией зачастую противоречивы в популяциях с разным генетическим фоном. Этнические различия в частотах аллелей, структуре гаплотипов и наличии специфических генетических модуляторов могут кардинальным образом влиять на фенотипические проявления полиморфных вариантов. Таким образом, данные, полученные на популяциях Азии, Африки или Западной Европы, не могут быть автоматически экстраполированы на население России, которое характеризуется уникальным и сложным генетическим ландшафтом, сформированным многовековой историей смешения славянских, финно-угорских, тюркских и других групп [15]. В частности, популяции Северо-Западного федерального округа (СЗФО) России демонстрируют отчётливый генетический профиль в рамках страны, что делает их особо интересным объектом для популяционно-генетических исследований [16]. Кроме того, циркулирующие в регионе штаммы ВИЧ представлены преимущественно генотипом А6 [17, 18], который имеет ограниченное распространение в мире и характеризуется определёнными молекулярно-биологическими особенностями. Взаимная адаптация, возникающая между генетическим фоном конкретной человеческой популяции и циркулирующими в ней вирусными вариантами, формирует уникальную эволюционную динамику, для понимания которой необходимы локальные региональные исследования. Несмотря на очевидную важность и потенциальную клиническую значимость, анализ ассоциаций полиморфных вариантов гена *TRIM22* с ВИЧ-инфекцией в российских популяциях, в частности в СЗФО, до настоящего времени практически не проводился. Восполнение этого пробела является необходимым шагом для более глубокого понимания патогенеза ВИЧ-инфекции, определения генетических маркеров индивидуаль-

ного риска и, в перспективе, разработки персонализированных подходов к профилактике и лечению данного заболевания. В связи с вышесказанным, особое внимание привлекают полиморфные варианты rs7935564 (A>G *N155D*) и rs1063303 (C>G *T242R*) гена *TRIM22*, ранее охарактеризованные в других географических регионах.

Целью исследования был анализ полиморфных вариантов rs7935564 (*N155D*) и rs1063303 (*T242R*) гена *TRIM22* у ВИЧ-инфицированных лиц в СЗФО.

Материалы и методы

В качестве материала для исследования использовали образцы цельной крови, полученные от 378 пациентов с ВИЧ-инфекцией, у которых наблюдалась вирусологическая неэффективность АРТ, и 319 практически здоровых лиц без острых или хронических инфекционных и соматических заболеваний на момент обследования, постоянно проживающих в СЗФО. В контрольной группе возраст варьировал от 18 до 60 лет и составил в среднем 38,9 года; мужчин ($n = 166$; 52,04%) было незначительно больше, чем женщин ($n = 153$; 47,96%). В группе ВИЧ-инфицированных лиц возраст варьировал от 18 до 73 лет и составил в среднем 38,3 года; доля мужчин ($n = 240$; 63,49%) была значительно больше, чем женщин ($n = 138$; 36,51%).

Важным аспектом формирования выборки являлся контроль факторов риска заражения ВИЧ. Все участники исследования (как целевой, так и контрольной группы) являются уроженцами и жителями СЗФО, отрицают причастность к каким-либо группам повышенного риска инфицирования ВИЧ (потребители инъекционных наркотиков, работники коммерческого секса, мужчины, практикующие секс с мужчинами, лица, имеющие половые контакты с представителями ключевых групп риска), а также практику рискованного полового поведения (непостоянное использование барьерной контрацепции, множественные половые связи), что предполагает общность социальной и эпидемиологической среды. Данный подход был направлен на минимизацию потенциальной систематической ошибки, связанной с неравной вероятностью встречи с вирусом в сравниваемых группах, и позволяет с большей уверенностью интерпретировать выявленные ассоциации как связанные именно с генетическими особенностями, а не с поведенческими факторами.

Выбор в качестве целевой группы пациентов с вирусологической неэффективностью АРТ был обусловлен необходимостью гарантированно включить в анализ лиц с установленным и подтвержденным диагнозом ВИЧ-инфекции, исключив возможные ошибки или невыявленную серореверсию. Данная когорта пациентов находится под постоян-

ным наблюдением, что обеспечило надёжность верификации диагноза и доступность необходимых биологических образцов.

Все участники были ознакомлены с целью и методологией исследования и подписали информированное согласие. На проведение данного исследования было получено положительное решение Локального этического комитета Санкт-Петербургского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (протокол № 110/а от 27.11.2020).

Экстракцию тотального препарата ДНК/РНК проводили с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп» (ЦНИИ Эпидемиологии) с использованием реагента «Гемолитик». Для амплификации фрагментов гена, содержащих целевые локусы *TRIM22* (rs7935564 A>G *N155D*; rs1063303 C>G *T242R*), использовали праймеры, описанные ранее [19, 20]. Состав амплификационной смеси представлял собой буферный раствор, содержащий Трис-НСl pH 8,8 (при 25°C), KCl, 6–7 мМ MgCl₂, дезоксинуклеозидтрифосфаты, глицерол, Твин-20, Taq+Phusion-полимеразы. Полимеразную цепную реакцию проводили при следующих условиях: после денатурации при 95°C в течение 15 мин устанавливали 45 циклов амплификации в режиме: 95°C — 30 с, 52–64°C — 30 с, 72°C — 1 мин 30 с — 3 мин 30 с; затем финальная элонгация при 72°C — 10 мин. Качество амплификации определяли визуально в 2% агарозном геле (120 В, 40 мин; 1хTBE), окрашенном бромистым этидием, с использованием системы гель-документации и последующим анализом на предмет наличия целевых фрагментов и их длины.

Продукты амплификации, как и в дальнейшем продукты секвенирующей реакции, очищали методом спиртового осаждения. Очищенный фрагмент с концентрацией 50–100 нг, в зависимости от нуклеотидного состава анализируемого участка, использовали для постановки секвенирующих реакций с прямыми и обратными амплификационными праймерами. Секвенирующую реакцию осуществляли с использованием набора реагентов «ABI PRISM BigDye Terminator v. 3.1» («Applied Biosystems»). Полученные фрагменты анализируемых образцов секвенировали при помощи генетического анализатора «ABI PRISM 3500» («Applied Biosystems»).

Статистическую обработку данных выполняли с помощью лицензионных программ MS Excel («Microsoft»), Prism 9.5.1 («GraphPad Software Inc.»). Осуществляли проверку соответствия распределения генотипов закону Харди–Вайнберга. Для оценки значимости различий использовали, в зависимости от характеристик выборок, точный критерий Фишера или критерий χ^2 с поправкой Йетса, расчёт отношения шансов (ОШ) с 95% доверительным интервалом (ДИ). Дополнительно оценивали величины коэффициента неравновесно-

го сцепления и рассчитывали частоту гаплотипов. В качестве порога достоверности отличий было определено значение вероятности $p < 0,05$.

Результаты

Распределение частот генотипов и аллелей исследованных полиморфных вариантов rs7935564 (A>G N155D) и rs1063303 (C>G T242R) гена TRIM22 с оценкой соответствия равновесию Харди–Вайнберга представлено в табл. 1.

В анализируемых группах распределение генотипов для всех полиморфных вариантов соответствовало ожиданиям равновесия Харди–Вайнберга ($p > 0,05$), что свидетельствует об отсутствии значительных отклонений, вызванных селекцией, миграцией или инбридингом, подтверждает репрезентативность сформированных выборок и надёжность полученных генетических данных.

Исходя из полученных данных, для комплексной оценки ассоциативной связи изученных поли-

морфных вариантов с наличием ВИЧ-инфекции был проведён расчёт ОШ в рамках 3 альтернативных моделей наследования: рецессивной, доминантной и аддитивной, результаты которого представлены в табл. 2. Провели оценку равновесности/неравновесности сцепления анализируемых локусов: $D = 0,0969$; $D' = 0,4478$; $r^2 = 0,1572$; $p < 0,001$. Таким образом, для двух анализируемых SNP в исследуемых группах показано умеренное неравновесное сцепление. Оценена частота гаплотипов в группах и проанализирована их ассоциация с ВИЧ-инфекцией (табл. 3).

Обсуждение

Белок TRIM22 демонстрирует сложный и многоуровневый механизм противовирусной активности, в частности, против ВИЧ. Его экспрессия в лимфоцитах периферической крови и конститутивно присутствующая в ряде тканей человека индуцируется под действием интерферонов как I, так и

Таблица 1. Распределение частот генотипов и аллелей, а также оценка соответствия распределения равновесию Харди–Вайнберга

Полиморфизм	Генотипы, аллели	Контрольная группа (n = 319)			ВИЧ-инфицированные лица (n = 378)		
		распределение генотипов, аллелей		p_{HWE}	распределение генотипов, аллелей		p_{HWE}
		n	%		n	%	
rs7935564 (A>G N155D)	A/A	103	32,29	0,3	98	25,93	0,68
	A/G	165	51,72		195	51,59	
	G/G	51	15,99		95	25,13	
	A	0,58	0,5				
	G	0,42	0,5				
rs1063303 (C>G T242R)	C/C	127	39,81	0,24	121	32,01	0,2
	C/G	140	43,89		197	52,12	
	G/G	52	16,3		60	15,87	
	C	0,62	0,58				
	G	0,38	0,42				

Примечание. p_{HWE} — уровень значимости при равновесии Харди–Вайнберга.

Таблица 2. Оценка ассоциации полиморфных вариантов с ВИЧ-инфекцией

Полиморфизм	Модель	Генотипы	ОШ	95% ДИ	p
rs7935564 (A>G N155D)	Доминантная	A/A	1		0,065
		A/G-G/G	1,36	0,98–1,89	
	Рецессивная	A/A-A/G	1		0,0029
		G/G	1,76	1,21–2,58	
	Аддитивная		1,37	1,11–1,71	0,0035
rs1063303 (C>G T242R)	Доминантная	C/C	1		0,032
		C/G-G/G	1,4	1,03–1,92	
	Рецессивная	C/C-C/G	1		0,88
		G/G	0,97	0,65–1,45	
	Аддитивная		1,17	0,94–1,45	0,16

Таблица 3. Ассоциация гаплотипов rs7935564/ rs1063303 с ВИЧ-инфекцией

rs7935564	rs1063303	Контрольная группа	ВИЧ-инфицированные лица	ОШ (95% ДИ)	p
A	C	0,454	0,3912	1	–
G	G	0,2518	0,3065	1,57 (1,16–2,12)	0,0033
G	C	0,1667	0,1895	1,21 (0,91–1,60)	0,2
A	G	0,1275	0,1128	0,89 (0,61–1,30)	0,55

II типа, а также модулируется в ответ на различные вирусные патогены и их антигены [21]. Одним из ключевых направлений противовирусного действия TRIM22 является подавление репликации ВИЧ, что было продемонстрировано в моделях промоноцитарных клеточных линий и первичных макрофагов, дифференцированных из моноцитов человека. Молекулярные механизмы этого подавления многогранны: TRIM22 способен ингибировать базальную активность промотора ВИЧ, не влияя при этом на Tat-зависимую или NF-κB-опосредованную транскрипцию, но эффективно блокируя экспрессию вирусных генов, опосредованную LTR и индуцированную фторболовыми эфирами и иономицином.

Хотя TRIM22, как и другие представители семейства TRIM, не обладает способностью к прямому связыванию с ДНК, он опосредует свой эффект за счёт интерференции с клеточными факторами транскрипции. В частности, было показано, что TRIM22 нарушает связывание транскрипционного фактора Sp1 с его консенсусными сайтами в LTR ВИЧ, что объясняется способностью coiled-coil (CC) домена этих белков к гетеротипическим белок-белковым взаимодействиям [22]. Двухдоменная организация TRIM22 определяет двойственность его функций: N-концевой домен RING обладает E3-убиквитинлигазной активностью, что приводит к полиубиквитинилированию вирусных белков-мишеней и их последующей деградации по протеасомному пути [23]. В то же время C-концевой CC-домен участвует в формировании высокомолекулярных белковых комплексов, опосредуя более сложные и менее изученные механизмы рестрикции, которые могут включать: нарушение сборки вирионов, вмешательство во внутриклеточный транспорт вирусных компонентов или модуляцию сигнальных путей врождённого иммунитета [24]. Важно отметить, что данный процесс не ограничивается прямой деградацией мишеней, но также опосредует активацию ключевых компонентов врождённого иммунитета. В частности, показано, что олигомеризованный TRIM22 способен специфически активировать NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2) — внутриклеточный паттерн-распознающий рецептор, играющий центральную роль в инициации провоспалительного ответа при обнаружении патогенов [25]. Активация NOD2 запускает каскад сигнальных событий, ведущих к активации NF-κB и продукции провоспалительных

цитокинов, что усиливает антимикробную защиту клетки. Таким образом, аминокислотные замены в суперспиральном домене, вызванные изучаемыми в настоящей работе полиморфными вариантами, потенциально могут нарушать процессы мультимеризации TRIM22, что, в свою очередь, может менять его способность к полиубиквитинилированию и ослаблять активацию NOD2-опосредованного иммунного ответа, снижая эффективность противовирусной защиты [26]. Данные *in vitro* свидетельствуют о том, что эти аминокислотные замены ассоциированы со снижением супрессорной активности белка в отношении транскрипции ВИЧ и коррелируют с более тяжёлым течением заболевания у инфицированных лиц [10], что предполагает их критическую роль в функциональной целостности белка и его способности координировать многокомпонентный противовирусный ответ.

Проведённое исследование представляет собой первый анализ ассоциации несинонимичных полиморфных вариантов гена *TRIM22* rs7935564 (*N155D*) и rs1063303 (*T242R*) с ВИЧ-инфекцией в популяции СЗФО. Полученные данные выявили сложный и разнонаправленный характер ассоциации изучаемых генетических вариантов с наличием ВИЧ-инфекции.

Ключевым результатом нашего исследования является выявление достоверной ассоциации rs7935564 с наличием ВИЧ-инфекции. Для аллеля G были получены убедительные доказательства его связи с наличием ВИЧ-инфекции. На это указывает значимость в наиболее мощной аддитивной модели (ОШ = 1,37; 95% ДИ 1,11–1,71; $p = 0,0035$), а также в рецессивной модели (ОШ = 1,76; 95% ДИ 1,21–2,58; $p = 0,0029$). Это позволяет предположить, что эффект данного варианта проявляется наиболее ярко в гомозиготном состоянии (G/G), что может быть связано с более выраженным изменением заряда и структуры белка в позиции 155, критически важной для его функционирования. Полученные нами результаты согласуются с результатами исследования в итальянской когорте, где была показана связь аллеля G rs7935564 гена *TRIM22* с ВИЧ-инфекцией [10]. Интересно отметить, что в цитируемом исследовании наиболее значимая ассоциация с быстрым прогрессированием ВИЧ-инфекции была выявлена в рамках доминантной модели наследования.

Наблюдаемое расхождение с нашими данными, в которых максимальная ассоциация была обнаружена для рецессивной модели, может иметь не-

сколько объяснений. Во-первых, фундаментальные различия в генетическом фоне между итальянской и северо-западной российской популяциями могут существенно влиять на паттерны генетических ассоциаций, включая модель наследования, что согласуется с известным феноменом популяционной специфичности геномной архитектуры сложных признаков. Во-вторых, критически важным фактором представляется дизайн исследования: в отличие от нашей работы, где анализировалась общая группа ВИЧ-инфицированных лиц с вирусологической неэффективностью АРТ, в исследовании S. Ghezzi и соавт. была проведена стратификация пациентов на подгруппы с разной скоростью прогрессирования заболевания. Такой подход позволяет выявить генетические детерминанты, специфически влияющие на скорость развития патологии, которые могут оставаться незамеченными при анализе нестратифицированной когорты. Кроме того, нельзя исключить, что различные модели наследования отражают плейотропный эффект изучаемого полиморфизма, который по-разному проявляется на разных стадиях инфекционного процесса — от первоначального заражения до поздних стадий иммунопатологии.

Для полиморфизма rs1063303 (*T242R*) полученные нами результаты менее однозначны. Несмотря на выявление слабой ассоциации в доминантной модели (ОШ = 1,40; 95% ДИ 1,03–1,92; $p = 0,032$), отсутствие значимости в аддитивной и рецессивной моделях, а также широкий ДИ, пересекающий единицу, не позволяют сделать однозначный вывод о его независимой роли в исследуемой выборке. Сходные исследования в других географических регионах дали противоречивые результаты. Так, в вышеупомянутом исследовании ВИЧ-прогрессоров в Италии не выявлено связи rs1063303 с заболеванием [10]. В то же время в указанном исследовании для гаплотипа rs7935564 G + rs1063303 G показана достоверно более высокая частота встречаемости среди ВИЧ-инфицированных лиц с быстрым прогрессированием заболевания, чем среди лиц с медленным прогрессированием. Кроме того, известно, что полиморфизм rs1063303 оказывает обратное функциональное воздействие, увеличивая экспрессию TRIM22 и снижая его противовирусную активность [27], а повышенная экспрессия TRIM22 в мононуклеарных клетках периферической крови пациентов, инфицированных ВИЧ, связана с более низкой вирусной нагрузкой [28].

Важным аспектом нашего анализа стала оценка неравновесия сцепления между изучаемыми локусами. Выявленные значения ($D' = 0,4478$; $r^2 = 0,1572$) указывают на наличие умеренного, но статистически значимого исторического сцепления, что, однако, не является достаточным для того, чтобы считать эти полиморфные варианты маркерами

друг друга. Низкое значение r^2 , в частности, свидетельствует о том, что лишь около 15% вариаций одного локуса могут быть объяснены вариациями другого. Это подтверждает, что выявленная ассоциация для rs1063303, скорее всего, является независимой, а не опосредованной через сцепление с rs7935564. Отметим, что согласно открытым генетическим базам данных, например, 1000 Genomes Project [29], анализируемые SNP показывают неравновесность сцепления от слабой до умеренной. В популяциях Восточной Азии можно ожидать сильного сцепления (значения D' могут быть высокими, $\sim 0,8$ – $1,0$), однако даже здесь показатель r^2 (который наиболее важен для прогнозирования) часто остаётся низким ($< 0,3$), то есть, несмотря на историческую тенденцию к совместному наследованию, по одному SNP нельзя уверенно предсказать другой. В европейских популяциях сцепление слабее (значения r^2 часто низкие, $< 0,2$) или отсутствует [10]. Несмотря на слабое или умеренное сцепление, «предпочтительным» (часто встречающимися вместе аллелями) гаплотипом rs7935564 — rs1063303 является *A-C*, а гаплотипом, связанным с наличием ВИЧ-инфекции, — *G-G*. В нашей работе гаплотип *A-C* был наиболее распространён и в контрольной, и в целевой группе. При этом мы не выявили логичного протективного эффекта этого гаплотипа по отношению к ВИЧ-инфекции, показана лишь тенденция к защитному эффекту, не достигшая статистической значимости. Напротив, для «гаплотипа риска» *G-G* подтверждена ассоциация с ВИЧ-инфекцией (ОШ = 1,57; 95% ДИ 1,16–2,12; $p = 0,0033$), что указывает на возможный синергетический эффект двух аминокислотных замен. Этот гаплотип может определять конформацию белка, которая менее эффективно подавляет репликацию ВИЧ или модулирует иммунный ответ таким образом, что косвенно способствует персистенции вируса.

Ограничением нашего исследования является его дизайн «случай–контроль», который не позволяет установить причинно-следственную связь, а также относительно небольшой размер выборки, что могло ограничить мощность для выявления слабых ассоциаций, особенно для rs1063303. Наши результаты иллюстрирует феномен популяционной специфичности генетических ассоциаций, который является общепризнанным в современной генетике сложных заболеваний [30, 31]. Это подчёркивает необходимость дальнейших лонгитюдных исследований с увеличением объёмов выборки и тщательным клинико-генетическим сопоставлением для полного раскрытия роли полиморфных вариантов гена *TRIM22* в патогенезе ВИЧ-инфекции.

Заключение

Проведённое исследование демонстрирует значимую ассоциацию несинонимичного полимор-

фного варианта rs7935564 (*N155D*) гена *TRIM22* с наличием ВИЧ-инфекции в популяции СЗФО, в то время как для варианта rs1063303 (*T242R*) получены статистически неоднозначные результаты. Выявленная ассоциация гаплотипа *G-G* (rs7935564_G — rs1063303_G) с наличием инфекции свидетельствует о потенциальном синергетическом эффекте данных аллелей. Полученные данные вносят вклад в понимание молекулярных механизмов врождённого противовирусного иммунитета, указывая на роль белка *TRIM22* в модуляции взаимодействия «вирус–хозяин» при ВИЧ-инфекции, и отражают важность учёта популяционной специфичности генетических факторов при изучении взаимодействия ВИЧ и организма хозяина.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Bekker L.G., Beyrer C., Mgodini N., et al. HIV infection. *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2023;9(1):42. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41572-023-00452-3>
2. Schemelev A.N., Davydenko V.S., Ostankova Y.V., et al. Involvement of human cellular proteins and structures in realization of the HIV life cycle: a comprehensive review, 2024. *Viruses*. 2024;16:1682. DOI: <https://doi.org/10.3390/v16111682>
3. Ali S., Mann-Nüttel R., Schulze A., et al. Sources of type I interferons in infectious immunity: plasmacytoid dendritic cells not always in the driver's seat. *Front. Immunol.* 2019;10:778. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00778>
4. Duggal N.K., Emerman M. Evolutionary conflicts between viruses and restriction factors shape immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2012;12(10):687–95. DOI: <https://doi.org/10.1038/nri3295>
5. Hatakeyama S. TRIM family proteins: roles in autophagy, immunity, and carcinogenesis. *Trends Biochem. Sci.* 2017;42(4): 297–311. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.01.002>
6. Liu Y. The role of TRIM proteins in antiviral defense. *HSET*. 2023;74:1655–60.
7. van Tol S., Hage A., Giraldo M.I., et al. The TRIMendous role of TRIMs in virus-host interactions. *Vaccines (Basel)*. 2017;5(3):23. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines5030023>
8. van Gent M., Sparrer K.M.J., Gack M.U. TRIM proteins and their roles in antiviral host defenses. *Annu. Rev. Virol.* 2018;5(1):385–405. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092917-043323>
9. Stremlau M., Owens C.M., Perron M.J., et al. The cytoplasmic body component TRIM5α restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature*. 2004;427(6977):848–53. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature02343>
10. Ghezzi S., Galli L., Kajaste-Rudnitski A., et al. Identification of TRIM22 single nucleotide polymorphisms associated with loss of inhibition of HIV-1 transcription and advanced HIV-1 disease. *AIDS*. 2013;27(15):2335–44. DOI: <https://doi.org/10.1097/01.aids.0000432474.76873.5f>
11. Turrini F., Marelli S., Kajaste-Rudnitski A., et al. HIV-1 transcriptional silencing caused by TRIM22 inhibition of Sp1 binding to the viral promoter. *Retrovirology*. 2015;12:104. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12977-015-0230-0>
12. Singh R., Patel V., Mureithi M.W., et al. TRIM5α and TRIM22 are differentially regulated according to HIV-1 infection phase and compartment. *J. Virol.* 2014;88(8):4291–303. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.03603-13>
13. Eldin P., Papon L., Oteiza A., et al. TRIM22 E3 ubiquitin ligase activity is required to mediate antiviral activity against encephalomyocarditis virus. *J. Gen. Virol.* 2009;90(Pt3):536–45. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.006288-0>
14. Kajaste-Rudnitski A., Marelli S.S., Pultrone C., et al. TRIM22 inhibits HIV-1 transcription independently of its E3 ubiquitin ligase activity, Tat, and NF-κB-responsive long terminal repeat elements. *J. Virol.* 2011;85(10):5183–96. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.02302-10>
15. Balanovsky O., Rootsi S., Pshenichnov A., et al. Two sources of the Russian patrilineal heritage in their Eurasian context. *Am. J. Hum. Genet.* 2008;82(1):236–50. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.09.019>
16. Yunusbayev B., Metspalu M., Metspalu E., et al. The genetic legacy of the expansion of Turkic-speaking nomads across Eurasia. *PLoS Genet.* 2015;11(4):e1005068. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005068>
17. Schemelev A.N., Ostankova Yu.V., Zueva E.B., et al. Detection of patient HIV-1 drug resistance mutations in Russia's Northwestern Federal District in patients with treatment failure. *Diagnostics*. 2022;12(8):1821. DOI: <https://doi.org/10.3390/diagnostics12081821>
18. Щемелев А.Н., Останкова Ю.В., Валутите Д.Э. и др. Риск неэффективности терапии первой линии у пациентов с ВИЧ в Северо-Западном федеральном округе России. *Инфекция и иммунитет*. 2023;13(2):302–8. Schemelev A.N., Ostankova Yu.V., Valutite D.E., et al. Risk assessment of first-line treatment failure in untreated HIV patients in Northwestern federal district of the Russian Federation. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2023;13(2):302–8. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-RAO-2122>
19. Mobasher S., Irani N., Sepahi A.A., et al. Evaluation of TRIM5 and TRIM22 polymorphisms on treatment responses in Iranian patients with chronic hepatitis C virus infection. *Gene*. 2018;676:95–100. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.07.023>
20. Boswell M.T., Yindom L.M., Hameiri-Bowen D., et al. TRIM22 genotype is not associated with markers of disease progression in children with HIV-1 infection. *AIDS*. 2021;35(15):2445–50. DOI: <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000003053>
21. Hattmann C.J., Kelly J.N., Barr S.D. TRIM22: A diverse and dynamic antiviral protein. *Mol. Biol. Int.* 2012;2012:153415. DOI: <https://doi.org/10.1155/2012/153415>
22. Pagani I., Poli G., Vicenzi E. TRIM22. A multitasking antiviral factor. *Cells*. 2021;10(8):1864. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells10081864>
23. Lian Q., Sun B. Interferons command Trim22 to fight against viruses. *Cell. Mol. Immunol.* 2017;14:794–6. DOI: <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.76>
24. Vicenzi E., Poli G. The interferon-stimulated gene TRIM22: A double-edged sword in HIV-1 infection. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2018;40:40–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2018.02.001>
25. Inoue A., Watanabe M., Kondo T., et al. TRIM22 negatively regulates MHC-II expression. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 2022;1869(10):119318. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2022.119318>
26. Li Q., Lee C.H., Peters L.A., et al. Variants in TRIM22 that affect NOD2 signaling are associated with very-early-onset inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2016;150:1196–207. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.01.031>
27. Kelly J.N., Woods M.W., Xhiku S., Barr S.D. Ancient and recent adaptive evolution in the antiviral TRIM22 gene: identification of a single-nucleotide polymorphism that impacts TRIM22 function. *Hum. Mutat.* 2014;35(9):1072–81. DOI: <https://doi.org/10.1002/humu.22595>
28. Singh R., Gaiha G., Werner L., et al. Association of TRIM22 with type 1 interferon response and viral control during primary HIV-1 infection. *J. Virol.* 2011;85(1):208–16. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.01810-10>

29. Auton A., Brooks L.D., Durbin R.M., et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526(7571):68–74. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature15393>
30. Prohaska A., Racimo F., Schork A.J., et al. Human disease variation in the light of population genomics. *Cell*. 2019;177(1): 115–31. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.052>
31. Brandes N., Weissbrod O., Linial M. Open problems in human trait genetics. *Genome Biol*. 2022;23(1):131. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13059-022-02697-9>

Информация об авторах

Останкова Юлия Владимировна[✉] — канд. биол. наук, зав. лаб. иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции, с. н. с. лаб. молекулярной иммунологии Санкт-Петербургского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия, shenna1@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2270-8897>

Давыденко Владимир Сергеевич — м. н. с. лаб. иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции Санкт-Петербургского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия, vladimir_david@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0078-9681>

Щемелев Александр Николаевич — канд. биол. наук, м. н. с. лаб. иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции Санкт-Петербургского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия, tvildorm@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-3139-3674>

Тотолян Арег Артемович — д-р мед. наук, профессор, академик РАН, зав. лаб. молекулярной иммунологии, директор Санкт-Петербургского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия, totolian@pasteurorg.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4571-8799>

Участие авторов: *Останкова Ю.В.* — концепция и план исследования, сбор и анализ данных, подготовка рукописи; *Давыденко В.С.* — сбор и анализ данных, подготовка рукописи; *Щемелев А.Н.* — сбор и анализ данных; *Тотолян А.А.* — концепция и план исследования, подготовка рукописи. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 13.08.2025;
принята к публикации 20.10.2025;
опубликована 31.10.2025

Information about the authors

Yulia V. Ostankova[✉] — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of immunology and virology of HIV, senior researcher, Laboratory of molecular immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, shenna1@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2270-8897>

Vladimir S. Davydenko — junior researcher, Laboratory of immunology and virology of HIV, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, vladimir_david@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0078-9681>

Alexander N. Schemelev — Cand. Sci. (Biol.), junior researcher, Laboratory of immunology and virology of HIV, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, tvildorm@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-3139-3674>

Areg A. Totolian — Dr. Sci. (Med.), Professor Academician of the Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of molecular immunology, Director, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, totolian@pasteurorg.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4571-8799>

Authors' contribution: *Ostankova Yu.V.* — concept and research plan, data collection and analysis, manuscript preparation; *Davydenko V.S.* — data collection and analysis, manuscript preparation; *Shchemelev A.N.* — data collection and analysis; *Totolyan A.A.* — concept and research plan, manuscript preparation. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a substantial contribution to the conception of the article, acquisition, analysis, interpretation of data for the article, drafting and revising the article, final approval of the version to be published.

The article was submitted 13.08.2025;
accepted for publication 20.10.2025;
published 31.10.2025



Генетическое типирование ДНК-изолятов *Coxiella burnetii*, выделенных от больных лихорадкой Ку в Ставропольском крае

Сирица Ю.В., Ульшина Д.В.[✉], Волынкина А.С., Васильева О.В., Гнусарева О.А., Михайлова М.Е., Куличенко А.Н.

Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия

Аннотация

Цель работы — генетическое типирование ДНК-изолятов *Coxiella burnetii*, выделенных на территории Ставропольского края (СК) в 2009–2023 гг., анализ генетической структуры популяции возбудителя лихорадки Ку в регионе.

Материалы и методы. В работе использовали сыворотки крови от лихорадящих больных, полученные из Центра гигиены и эпидемиологии в Ставропольском крае в 2009–2023 гг. Проводили мультиспейсерное типирование (MST) *C. burnetii*, определяли принадлежность к MST-типу с помощью интернет-ресурса (<http://ifr48.timone.univ-mrs.fr>). Филогенетическое дерево строили в программе «MEGA». Плазмидное типирование осуществляли с использованием типоспецифичных праймеров к локусам плазмид QpH1, QpRS, QpDV, визуализацию полученных продуктов амплификации — путём проведения электрофореза в 2% агарозном геле. Территориальное распространение генетических вариантов анализировали с использованием программного обеспечения ArcGIS 10.1.

Результаты. В ходе молекулярно-генетического типирования *C. burnetii* установлено, что на территории СК циркулируют штаммы возбудителя коксиеллёза, относящиеся к двум генотипам: *MST7* и *MST28* монофилетической группы I. Доминирующим генотипом на территории восточных районов СК является *MST7*, северных районов — *MST28*. На территории СК циркулирует возбудитель лихорадки Ку с единственным плазмидным типом — QpH1.

Заключение. Определение плазмидного и MST-типа позволяет генотипировать ДНК изоляты *C. burnetii* без выделения чистой культуры, что может помочь при расследовании вспышек и формировании базы данных региональных ДНК изолятов.

Ключевые слова: лихорадка Ку, *Coxiella burnetii*, мультиспейсерное типирование, плазмидное типирование, Ставропольский край

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом Ставропольского государственного медицинского университета (заключение № 112 от 19.05.2023).

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

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

Для цитирования: Сирица Ю.В., Ульшина Д.В., Волынкина А.С., Васильева О.В., Гнусарева О.А., Михайлова М.Е., Куличенко А.Н. Генетическое типирование ДНК изолятов *Coxiella burnetii*, выделенных от больных лихорадкой Ку в Ставропольском крае. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2025;102(5): 539–546.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-745>

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

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-745>

Genetic typing of DNA of isolates of *Coxiella burnetii* isolated from patients with Q fever in the Stavropol Territory

Yulia V. Siritsa, Diana V. Ul'shina[✉], Anna S. Volynkina, Oksana V. Vasilieva, Olga A. Gnusareva, Marina E. Mikhailova, Alexandr N. Kulichenko

Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia

Abstract

The aim of the study is to genetically type DNA of isolates of *Coxiella burnetii* obtained in the Stavropol Territory (ST) from 2009 to 2023, and to analyze the genetic structure of the Q fever pathogen population in the region.

Materials and methods. The study used blood sera from febrile patients obtained from the Center for Hygiene and Epidemiology in the Stavropol Territory between 2009 and 2023. MST typing of *C. burnetii* was performed, and the MST type was determined using an online resource (<http://ifr48.timone.univ-mrs.fr>). The phylogenetic tree was constructed using the MEGA software. Plasmid typing was performed using type-specific primers for the QpH1, QpRS and QpDV plasmid loci, and the resulting amplification products were visualized by electrophoresis in a 2% agarose gel. The territorial distribution of genetic variants was analyzed using ArcGIS 10.1 software.

Results. Molecular genetic typing of *C. burnetii* has established that strains of the pathogen of Q fever belonging to two genotypes, MST7 and MST28 of monophyletic group I, are circulating in the Stavropol Territory. The dominant genotype in the eastern regions of the Stavropol territory is MST7, and in the northern regions, it is MST28. The pathogen of Q fever circulating in the Stavropol Territory is of a single plasmid type, QpH1.

Conclusion. Determining the plasmid and MST type allows for the genotyping of *C. burnetii* DNA isolates without isolating a pure culture, which can be helpful in outbreak investigations and the creation of a regional DNA isolate database.

Keywords: Q fever, *Coxiella burnetii*, multi-spacer typing, plasmid typing, Stavropol Krai

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The study protocol was approved by the Local Ethics Committee of the Stavropol State Medical University (protocol No. 112, May 05, 2023).

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

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

For citation: Siritsa Yu.V., Ul'shina D.V., Volinkina A.S., Vasilieva O.V., Gnusareva O.A., Mikhailova M.E., Kulichenko A.N. Genetic typing of DNA of isolates of *Coxiella burnetii* isolated from patients with Q fever in the Stavropol Territory. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(5):539–546.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-745>

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

Введение

Лихорадка Ку — природно-очаговое зоонозное заболевание, характеризующееся полиморфизмом клинических симптомов, способное вызывать у человека тяжёлые осложнения и переходить в хроническую форму.

Источником заражения человека, как правило, является мелкий и крупный рогатый скот. При этом основные пути передачи инфекции — аспирационный и контактный, в меньшей степени — алиментарный. Факторами передачи возбудителя инфекции выступают сырые животного происхождения, мясо-молочные продукты, предметы ухода за животными и другие объекты, инфицированные коксиеллами [1, 2].

В настоящее время спорадическая и вспышечная заболеваемость лихорадкой Ку наблюдается практически во всех регионах мира [3–9]. В России коксиеллёз регистрируется более чем на 50 административных территориях. В Ставропольском крае (СК) заболеваемость лихорадкой Ку с 2016 г. фиксируется ежегодно. Краевой показатель заболеваемости превышает среднероссийский в 27,5 раза, а средний по Северо-Кавказскому федеральному округу — в 3,6 раза¹.

Таким образом, сложившаяся к настоящему времени эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация по коксиеллёзу обуславливает необходимость проведения системного мониторинга за циркуляцией *Coxiella burnetii* на территории СК.

В последние годы возросла роль молекулярно-генетических исследований при осуществлении мониторинга за состоянием популяции возбудителей особо опасных инфекций и эпидемиологической расшифровки случаев заболевания [10]. Дифференциация штаммов *C. burnetii* и изучение структуры популяции связаны с трудностями, обусловленными сложностью культивирования коксиелл в лабораторных условиях, их высокой патогенностью, низкой степенью генетической гетерогенности внутри вида [4].

Для генетического типирования штаммов и изолятов *C. burnetii* применяется совокупность методов: анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов [11], гель-электрофорез в пульсирующем поле [12–14], селективная амплификация расщеплённых эндонуклеазами рестрикции фрагментов [15], метод типирования по числу копий мобильного элемента IS1111 [16], метод типирования по особенностям однонуклеотидных полиморфизмов [17].

Наибольшей дифференцирующей способностью и универсальностью обладают методы, основанные на анализе областей генома с варибельным числом tandemных повторов [18], а также метод мультиспейсерного типирования (MST) [19].

¹ Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Ставропольском крае в 2023 году». Ставрополь; 2023. 129 с.

URL: <https://26.rospotrebnadzor.ru/doc/gd/doklad23.pdf>

MST основано на анализе последовательности межгенных регионов, расположенных между открытыми рамками считывания. Основное достоинство метода — использование потенциально высоковариабельных мишеней, не подвергающихся эволюционному давлению, что обуславливает лучшую дифференциацию штаммов внутри консервативных биологических видов [19, 20]. В настоящее время метод MST используется в большинстве лабораторий мира для идентификации штаммов *C. burnetii* и позволяет провести внутривидовое субтипирование геновариантов разного географического происхождения, без выделения культуры [21, 22].

MST может быть успешно применено для отслеживания происхождения изолятов возбудителя, что будет наиболее актуальным при расшифровке эпидемических вспышек этой инфекции. Повышению эффективности организации эпидемиологического надзора за коксиеллёзом будет способствовать накопление сведений о генетических особенностях штаммов *C. burnetii*, циркулирующих на территории отдельных регионов. Использование метода MST для генотипирования возбудителя лихорадки Ку, выделенного на территории СК, позволит получить новую информацию о генетической структуре популяции *C. burnetii* в регионе и сформировать базу данных для эпидемиологического расследования случаев коксиеллёза.

Цель работы — провести типирование ДНК изолятов *C. burnetii*, выделенных на территории СК в 2009–2023 гг., проанализировать молекулярно-генетическую структуру популяции в регионе.

Материалы и методы

На наличие ДНК *C. burnetii* исследовали 1472 образца сывороток крови от лихорадящих больных, полученных из Центра гигиены и эпидемиологии в Ставропольском крае в 2009–2023 гг. Работу с клиническим материалом осуществляли при добровольном информированном согласии пациентов.

Экстракцию ДНК из проб сыворотки крови выполняли с помощью набора реагентов «РИБО-преп» (ЦНИИ Эпидемиологии). Индикацию ДНК *C. burnetii* в исследованном материале осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с применением набора реагентов «Ампли-Сенс *Coxiella burnetii*-FL» (ЦНИИ Эпидемиологии) в соответствии с МР 3.1.0281-22². Определение плазмидного профиля и принадлежность к MST-генотипу проводили для положительных образцов с достаточной целевой нагрузкой ДНК патогена ($Ct \leq 25$).

Таблица 1. Последовательности праймеров для MST

Локус/длина фрагмента, п. о.	Направление праймера	Последовательность (5'–3')
Cox2/397	forward	GAAGCTTCTGATAGGCGGGA
	reverse	CAACCCTGAATACCCAAGGA
Cox5/395	forward	TGGTATGACAACCCGTCATG
	reverse	CAGGAGCAAGCTTGAATGCG
Cox18/557	forward	TTCGATGATCCGATGGCCTT
	reverse	CGCAGACGAATTAGCCAATC
Cox20/631	forward	TCTATTATTGCAATGCAAGTGG
	reverse	GATATTTATCAGCGTCAAAGCAA
Cox22/383	forward	CGCAAATTCGGCACAGACC
	reverse	GGGAATAAGAGAGTTAGCTCA
Cox37/463	forward	ATCCCGGGACCTTCGTTAAC
	reverse	GGCTTGTCTGGTGTAAGTGT
Cox51/674	forward	GCGAGAACCGAATTGCTATC
	reverse	TAACGCCCGAGAGCTCAGAA
Cox56/479	forward	ATGCCCCAGAAACGCATAGG
	reverse	CAAGCTCTCTGTGCCCAAT
Cox57/617	forward	GGTGAAGGCGTAAGCCTTT
	reverse	TGGAAATGGAAGGCGGATTC
Cox61/611	forward	GGGATTTCAACTTCCGATAGA
	reverse	GAAGATAGAGCGGCAAGGAT

MST осуществляли по методике, предложенной О.О. Глазуновой и соавт. [19]. Для амплификации нуклеотидных последовательностей каждого из 10 некодирующих межгенных спейсеров использовали отдельную реакционную смесь с парой праймеров к консервативному участку (табл. 1). Амплификацию проводили с использованием готовой реакционной смеси «БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2×)» («Биолабмикс»). Состав реакционной смеси: праймер F ($C = 10$ пмоль/мкл) — 1,25 мкл, праймер R ($C = 10$ пмоль/мкл) — 1,25 мкл, смесь «БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2×)» — 12,5 мкл, объём образца — 10 мкл. ПЦР проводили на ДНК-амплификаторе «T100» («Bio-Rad»), программа термоциклирования: первоначальная денатурация (95°C — 5 мин); второй этап — 40 циклов (95°C — 20 с, 57°C — 30 с, 72°C — 1 мин); финальная элонгация (72°C — 5 мин). Секвенирование по Сэнгеру осуществляли на капиллярном секвенаторе «Applied Biosystems 3500». Сборку последовательностей выполняли в программе «VectorNTI»³. При определении MST-группы проводили сравнение с референсными геномными последовательностями 85 штаммов *C. burnetii*, выделенных в 1945–2025 гг. в разных регионах из

² Методические рекомендации МР 3.1.0281-22 «Эпидемиологический надзор, лабораторная диагностика и профилактика лихорадки Ку» (утв. Руководителем Роспотребнадзора 08.04.2022).

³ URL: <https://vector-nti.software.informer.com/>

Таблица 2. Последовательности праймеров для определения плазмидного типа

Тип плазмиды	Направление праймера	Последовательность (5'–3')
QpH1	forward	CTCCAGTAGGGTAATGGTGTC
	reverse	GCCTTGGCTGGCACCTG
QpRS	forward	ATGTCAACAGATGACTCATC
	reverse	CTAGGATAATGAGAGTCTATC
QpDV	forward	GAGTCTACTCAGTGATAG
	reverse	TTACCGGTATTTCTCGA

онлайн-базы⁴ данных MST-типов. Дендрограмму на основании результатов MST строили в программе «MEGA 10»⁵.

Анализ территориального распространения генетических вариантов и построение карты выполнено с использованием программного обеспечения «ArcGIS 10.1».

Плазмидное типирование проводили методом ПЦР с типоспецифичными праймерами к локусам плазмид QpH1, QpRS, QpDV (табл. 2) с использованием набора «БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2×)» («Биолабмикс»). Состав реакционной смеси: праймер F (C = 10 пмоль/мкл) — 1,25 мкл, праймер R (C = 10 пмоль/мкл) — 1,25 мкл, смесь «БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2×)» — 12,5 мкл, объём пробы — 10 мкл. ПЦР проводили на ДНК-амплификаторе «T100» («Bio-Rad») в следующем режиме: первоначальная денатурация (95°C — 5 мин), 40 циклов (95°C — 20 с; 56°C — 30 с; 72°C — 45 с); финальная элонгация (72°C — 5 мин). Визуализацию продуктов амплификации осуществляли путём проведения электрофореза в 2% агарозном геле с интеркалирующим красителем (бромистым этидием) [4].

Результаты

При исследовании 1472 проб сывороток крови от лихорадящих больных из СК в 192 образцах выявлена ДНК возбудителя лихорадки Ку. Молекулярно-генетическое типирование (принадлежность к MST-генотипам и типам плазмидных профилей) выполнено для 60 ДНК-изолятов *C. burnetii* с достаточным для анализа количеством целевой ДНК патогена (Ct ≤ 25). Полученные данные использовали для изучения распространения геновариантов возбудителя лихорадки Ку на территории СК в 2009–2023 гг.

Генетическое типирование ДНК-изолятов *C. burnetii* методом MST

В результате проведённого MST установлена принадлежность выделенных на территории СК

ДНК изолятов *C. burnetii* к двум генотипам: *MST7* (55 образцов, 2009–2023 гг.) и *MST28* (5 образцов, 2010–2011, 2020 гг.). ДНК-изоляты генотипа *MST7* выявлены в 55 образцах от больных лихорадкой Ку в 14 районах СК: Буденновском (15), Курском (14), Ипатовском (4) Советском (4), Шпаковском (4), Нефтекумском (3), Благодарненском (3), Апанасенковском (1), Георгиевском (2), Красногвардейском (1), Левокумском (1), Туркменском (1), Кировском (1) и Грачевском (1); **рис. 1**. К генотипу *MST28* отнесены 5 ДНК изолятов *C. burnetii* из Апанасенковского (2), Ипатовского (2) и Нефтекумского (1) районов.

ДНК-изоляты *C. burnetii*, изученные в рамках данного исследования, относились к I монофилетической группе и локализованы на дендрограмме в составе отдельных двух клад (**рис. 2**).

Плазмидное типирование ДНК-изолятов *C. burnetii*

В дополнение к MST для всех выделенных ДНК изолятов определили плазмидный профиль. Установили, что на территории СК циркулирует возбудитель коксиеллёза, принадлежащий к плазмидному типу QpH1 [23]. ДНК-изоляты, содержащие плазмиды QpRS и QpDV, в исследованных пробах не выявили.

Обсуждение

В ходе интерпретации полученных данных обнаружено, что генетические структуры популяций *C. burnetii* в СК и других регионах РФ различаются. Ранее проведённые генетические исследования коллекции штаммов возбудителя лихорадки Ку, изолированных из образцов объектов окружающей среды на территории Ленинградской и Псковской областей, позволили установить, что доминирующим генотипом *C. burnetii* на территории изученных регионов является *MST23* (монофилетическая группа II) [4].

В результате анализа информации, содержащейся в базе данных MST-генотипов *C. burnetii*, показано, что штаммы генотипа *MST7* (3 штамма) ранее были выделены из клинического материала на территории России (Ленинград, 1955, 1957 гг.) и Франции (1993 г.). Штаммы *C. burnetii* генотипа *MST28* (4 штамма) изолированы из клинического материала на территории Казахстана (1962, 1965 гг.).

Штаммы генотипа *MST7* (монофилетическая группа I), широко распространённые на территории СК, в России впервые были изолированы при расследовании вспышек коксиеллёза в Ленинграде в 1955 и 1957 гг. и ранее считались уникальными для России, имеющими завозное происхождение из стран Центральной Азии, т. к. все заболевшие лихорадкой Ку были работниками, занятыми переработкой хлопка, привезённого из Центральной Азии,

⁴ URL: <http://ifr48.timone.univ-mrs.fr>

⁵ URL: <https://www.megasoftware.net/>

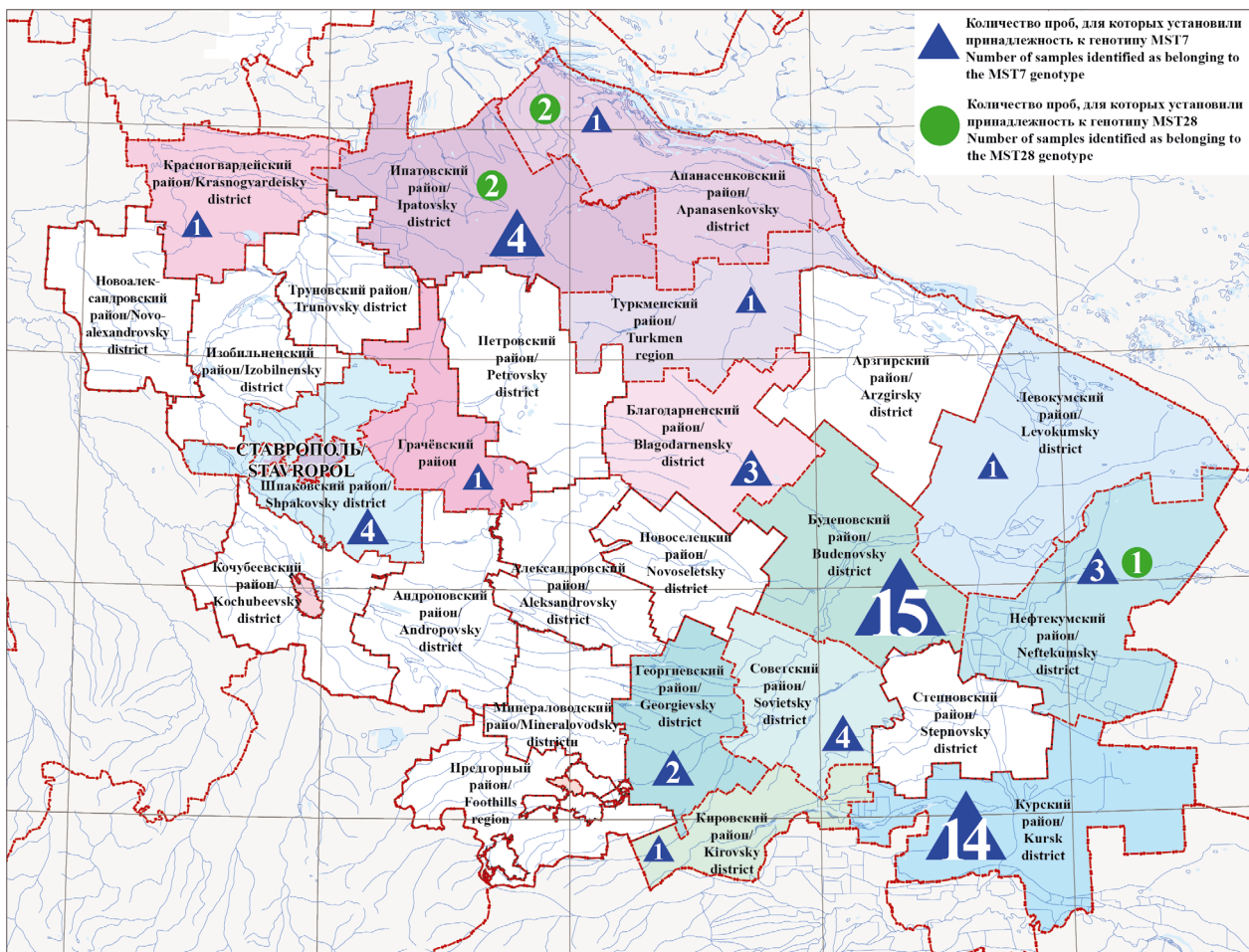


Рис. 1. Территориальное распространение MST-генотипов *C. burnetii* в СК (2009–2023 гг.).

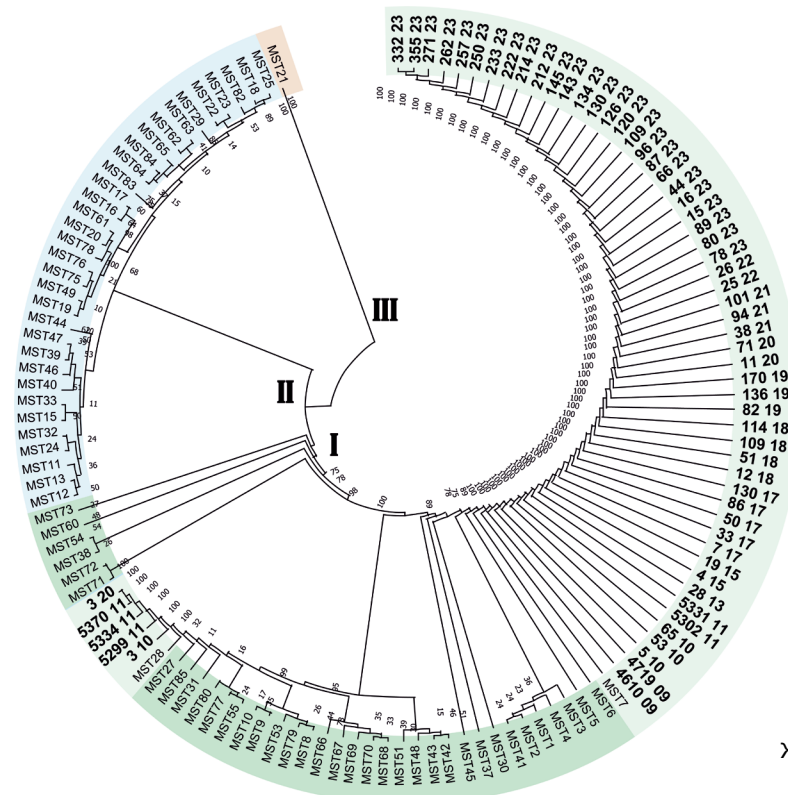


Рис. 2. Кластерный анализ 60 ДНК-изолятов *C. burnetii* на основании данных MST.

Дендрограмма построена по алгоритму UPGMA.
Отмечены 3 монофилетические линии (I, II, III).
Жирным шрифтом отмечены изоляты, секвенированные
в Ставропольском противочумном институте
Роспотребнадзора.

где в то время наблюдалась энзоотия по лихорадке Ку [4, 24].

ДНК-изоляты *C. burnetii*, относящиеся к генотипу *MST28*, на территории России выявлены впервые, ранее штаммы данного генотипа были также изолированы в Центральной Азии (Казахстан).

Всё вышеперечисленное позволяет сделать предположение о том, что оба генотипа (*MST7* и *MST28*), циркулирующие на территории СК, вероятно, завезены в регион из Центральной Азии. Однако, в связи с ограниченным количеством данных о генетических характеристиках штаммов *C. burnetii*, распространённых в России и других регионах мира, требуется дальнейшее изучение особенностей территориального распространения генотипов *C. burnetii* в разных областях России, в том числе в Астраханской и Ростовской областях, где ежегодно регистрируется высокий уровень заболеваемости лихорадкой Ку, а также странах Центральной Азии для выявления доминирующих геновариантов и установления вероятных путей заноса возбудителя лихорадки Ку в отдельные регионы РФ.

Полученные в данном исследовании новые сведения о распространении на территории СК штаммов *C. burnetii*, относящихся к генотипам *MST7* и *MST28*, могут быть использованы при эпидемиологическом расследовании вспышек и спорадических случаев заболевания лихорадкой Ку в регионах России.

На основании данных проведённого исследования сделано предположение об однородности популяции *C. burnetii* на территории СК по плазмидному типу. Известно, что принадлежность к плазмидному типу QpH1 свойственна для штаммов разного географического происхождения. Штаммы и изоляты с плазмидным генотипом QpH1 были выделены ранее в России и в странах Европы (Франция, Швейцария, Германия, Румыния, Словакия, Греция, Чехословакия, Украина, Австрия) Центральной Азии (Узбекистан, Казахстан, Монголия), Америки (США, Канада) и Западной Африки (Сенегал и Гвинейская Республика).

При сравнении выделенных на территории СК плазмидных профилей и *MST*-типов ДНК-изолятов и штаммов из онлайн-базы данных установили, что ранее изолированные штаммы возбудителя лихорадки Ку с генотипами *MST7* (Россия, Франция) и *MST28* (Казахстан) принадлежали к плазмиде типа QpRS [19]. В свою очередь, выделенные в настоящем исследовании ДНК-изоляты с аналогичными *MST*-типами, напротив, принадлежали к плазмидному типу QpH1.

К настоящему времени плазмидные гены, достоверно ассоциирующиеся с вирулентностью патогена, не обнаружены. Существует предложение о том, что штаммы с плазмидой QpH1 — более эволюционно древние представители популяции возбудителя,

циркулирующие в природных очагах, характеризующиеся низким эпидемическим потенциалом [25]. Так, ранее изолированные и вызвавшие вспышку в Ленинграде (1955 и 1957 гг.) штаммы *C. burnetii* (Ленинград-2, Ленинград-4) принадлежали к генотипу *MST7*, плазмидному типу QpRS [24, 26]. В то же время к плазмидному типу QpH1 принадлежал штамм *C. burnetii* NL3262, вызвавший массовую вспышку лихорадки Ку в Голландии в 2007–2010 гг. [1]. В связи с этим предположение о недостаточном патогенном потенциале штаммов *C. burnetii* с плазмидным типом QpH1, необходимом для реализации эпидемического процесса, нуждается в дальнейшем экспериментальном и теоретическом обосновании.

Заключение

В ходе молекулярно-генетического типирования *C. burnetii* установлено, что на территории СК циркулирует возбудитель коксиеллёза, относящийся к двум генотипам: *MST7* и *MST28* монофилетической группы I. Доминирующим генотипом на территории восточных районов СК является *MST7*, в северных районах края распространены штаммы генотипа *MST28*. Установлено также, что на территории СК в 2009–2023 гг. циркулировали варианты возбудителя лихорадки Ку с единственным плазмидным типом — QpH1.

Полученная в ходе настоящего исследования информация о встречающихся на территории СК генотипах *C. burnetii* (*MST* и плазмидное типирование) позволит провести анализ генетической структуры популяции возбудителя коксиеллёза, а также может быть использована при эпидемиологическом расследовании возможных случаев вспышек (завозные случаи) для определения источника и путей распространения инфекции.

Определение плазмидного и *MST*-типа позволяет генотипировать ДНК-изоляты *C. burnetii* без выделения чистой культуры, что может помочь при расследовании вспышек и формировании базы данных региональных ДНК изолятов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Шпынов С.Н., Рудаков Н.В., Зеликман С.Ю., Транквилевский Д.В. Анализ геномов *Coxiella burnetii* при изучении эпидемии лихорадки Ку. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2022;7(2):94–101. Shpynov S.N., Rudakov N.V., Zelikman S.Yu., Trankvilevskiy D.V. Analysis of *Coxiella burnetii* genomes in context of epidemic Q fever. *Fundamental and Clinical Medicine*. 2022;7(2):94–101. DOI: <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2022-7-2-94-101> EDN: <https://elibrary.ru/iffhvn>
2. Рудаков Н.В., Егембердиева Р.А., Дуйсенова А.К. *Клещевые трансмиссивные инфекции человека*. Омск; 2016. Rudakov N.V., Egemberdieva R.A., Duisenova A.K. *Human Tick-Borne Infections*. Омск; 2016. EDN: <https://elibrary.ru/xdxbkt>
3. Georgiev M., Afonso A., Neubauer H., et al. Q fever in humans and farm animals in four European countries, 1982 to 2010. *Euro Surveill*. 2013;18(8):20407.

4. Фрейлихман О.А., Токаревич Н.К., Кондрашова В.Д. Лабораторные методы диагностики Ку лихорадки и генотипирование *Coxiella burnetii*. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. Журнал имени академика Н.Д. Юсупова*. 2017;(2):49–60. Freylikhman O.A., Tokarevich N.K., Kondrashova V.D. Methods of laboratory diagnosis of Q fever and genotyping of *Coxiella burnetii*. *Infectious Diseases: News, Opinions, Training*. 2017;(2):49–60. EDN: <https://elibrary.ru/ylzuqgd>
5. Brooke R.J., Schneeberger P.M., Hoek W. Q fever in the Netherlands? A review. *Culture*. 2011;32(1):5–7.
6. Porten K., Rissland J., Tigges A., et al. A super-spreading ewe infects hundreds with Q fever at a farmers' market in Germany. *BMC Infect. Dis.* 2006;6:147. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-6-147>
7. Santoro D., Giura R., Colombo M.C., et al. Q fever in Como, Northern Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 2004;10(1):159–60. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1001.030467>
8. Wattiau P., Boldisova E., Toman R., et al. Q fever in Woolsorters, Belgium. *Emerg. Infect. Dis.* 2011;17(12):2368–9. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1712.101786>
9. van Woerden H.C., Mason B.W., Nehaul L.K., et al. Q fever outbreak in industrial setting. *Emerg. Infect. Dis.* 2004;10(7):1282–9. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1007.030536>
10. Панферова Ю.А. Молекулярно-генетические основы физиологии и патогенности *Coxiella burnetii*. *Инфекция и иммунитет*. 2012;2(3):615–26. Panferova Yu.A. Molecular-genetic basis of physiology and pathogenicity of *Coxiella burnetii*. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2012;2(3):615–26. EDN: <https://elibrary.ru/pccucx>
11. Hendrix L.R., Samuel J.E., Mallavia L.P. Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by analysis of restriction-endonuclease-digested DNA separated by SDS-PAGE. *J. Gen. Microbiol.* 1991;137(2):269–76. DOI: <https://doi.org/10.1099/00221287-137-2-269>
12. Heinzen R.A., Frazier M.E., Mallavia L.P. Nucleotide sequence of *Coxiella burnetii* superoxide dismutase. *Nucleic Acids Res.* 1990;18(21): 6437. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/18.21.6437>
13. Jäger C., Willems H., Thiele D., Baljer G. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates. *Epidemiol. Infect.* 1998;120(2):157–64. DOI: <https://doi.org/10.1017/s0950268897008510>
14. Thiele D., Willems H., Köpf G., Krauss H. Polymorphism in DNA restriction patterns of *Coxiella burnetii* isolates investigated by pulsed field gel electrophoresis and image analysis. *Eur. J. Epidemiol.* 1993;9(4):419–25. DOI: <https://doi.org/10.1007/bf00157400>
15. Arricau-Bouvery N., Hauck Y., Bejaoui A., et al. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. *BMC Microbiol.* 2006;6:38. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-38>
16. Denison A.M., Thompson H.A., Massung R.F. IS1111 insertion sequences of *Coxiella burnetii*: characterization and use for repetitive element PCR-based differentiation of *Coxiella burnetii* isolates. *BMC Microbiol.* 2007;7:91. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-91>
17. Priestley R.A., Hornstra H.M., Pearson T., et al. The state of the SNP: using real-time PCR to genotype *Coxiella burnetii*. In: *Abstract № 34, 23rd Meeting of the American Society for Rickettsiology*. Hilton Head;2009.
18. Svraka S., Toman R., Skultety L., et al. Establishment of a genotyping scheme for *Coxiella burnetii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2006;254(2):268–74. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2005.00036.x>
19. Glazunova O., Roux V., Freylikman O., et al. *Coxiella burnetii* genotyping. *Emerg. Infect. Dis.* 2005;11(8):1211–7. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1108.041354>
20. Волкова Р.А., Сколотнева Е.С., Эльберт Е.В. и др. Прямые и косвенные методы определения нуклеотидного состава ДНК последовательностей микроорганизмов. *Биопрепараты*. 2015;(2):9–14. Volkova R.A., Skolotneva E.S., Elbert E.V., et al. Elbert Direct and indirect methods of determining DNA nucleotide sequences in microorganisms. *Biopreparation (Biopharmaceuticals)* 2015;(2):9–14. EDN: <https://elibrary.ru/uckkox>
21. Di Domenico M., Curini V., De Massis F., et al. *Coxiella burnetii* in central Italy: novel genotypes are circulating in cattle and goats. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2014;14(10):710–5. DOI: <https://doi.org/10.1089/vbz.2014.1587>
22. Kumsa B., Socolovschi C., Almeras L., et al. Occurrence and genotyping of *Coxiella burnetii* in ixodid ticks in Oromia, Ethiopia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2015;93(5):1074–81. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0758>
23. Сирица Ю.В., Гнусарева О.А., Васильева О.В. и др. Плазмидное типирование ДНК изолятов *Coxiella burnetii*, выделенных от больных лихорадкой Ку в Ставропольском крае. *Национальные приоритеты России*. 2024;55(4):76–78. Siritsa Yu.V., Gnusareva O.A., Vasilieva O.V., et al. Plasmid typing of DNA isolates of *Coxiella burnetii* obtained from patients with coxiellosis in the Stavropol Territory. *National priorities of Russia*. 2024;55(4):76–78. EDN: <https://elibrary.ru/krfbgh>
24. Панферова Ю.А. Генотипирование штаммов и изолятов *Coxiella burnetii*, циркулирующих на территории России и Украины, с помощью плазмидного анализа. В кн.: *Фундаментальные и прикладные аспекты анализа риска здоровья населения: материалы Всероссийской научно-практической интернет-конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора*. Пермь;2016. Panferova Yu.A. Genotyping of *Coxiella burnetii* strains and isolates circulating in Russia and Ukraine using plasmid analysis. In: *Fundamental and Applied Aspects of Public Health Risk Analysis: materials of the All-Russian scientific-practical online conference of young scientists and specialists of Rospotrebnadzor*. Perm'; 2016.
25. Abou Abdallah R., Million M., Delerce J., et al. Pangenomic analysis of *Coxiella burnetii* unveils new traits in genome architecture. *Front Microbiol.* 2022;13:1022356. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1022356>
26. Freylikhman O., Kiselev A., Kazakov S., et al. Draft genome sequence of *Coxiella burnetii* historical strain Leningrad-2, isolated from blood of a patient with acute Q fever in Saint Petersburg, Russia. *Genome Announc.* 2018;6(3):e01464–17. DOI: <https://doi.org/10.1128/genomea.01464-17>

Информация об авторах

Сирица Юлия Владимировна — н. с. лаб. диагностики бактериальных инфекций Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, merendera@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9442-6966>

Ульшина Диана Васильевна[✉] — канд. биол. наук, с. н. с. лаб. диагностики бактериальных инфекций Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, vladidiana@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7754-2201>

Information about the authors

Yulia V. Siritsa — researcher, Laboratory for diagnostics of bacterial infections, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, merendera@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9442-6966>

Diana V. Ul'shina[✉] — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory for diagnostics of bacterial infections, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, vladidiana@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7754-2201>

Волынкина Анна Сергеевна — канд. биол. наук, зав. лаб. диагностики вирусных инфекций Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, volyn444@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5554-5882>

Васильева Оксана Васильевна — канд. мед. наук, зав. лаб. диагностики бактериальных инфекций Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, ksusha.vasilieva@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-8882-6477>

Гнусарева Ольга Александровна — н. с. лаб. диагностики бактериальных инфекций Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, gnusarevao@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9044-1808>

Михайлова Марина Евгеньевна — н. с. лаб. диагностики бактериальных инфекций Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, stavnipchi@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0000-3647-2550>

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

Участие авторов: *Сирица Ю.В.* — лабораторные исследования, концепция исследования, написание текста статьи; *Ульшина Д.В., Васильева О.В.* — написание текста статьи; *Волынкина А.С.* — редактирование статьи; *Гнусарева О.А., Михайлова М.Е.* — лабораторные исследования; *Куличенко А.Н.* — концепция исследования, 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 15.08.2025;
принята к публикации 20.10.2025;
опубликована 31.10.2025

Anna S. Volynkina — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory for diagnostics of viral infections, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, volyn444@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5554-5882>

Oksana V. Vasilieva — Cand. Sci. (Med.), Head, Laboratory for diagnostics of bacterial infections, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, ksusha.vasilieva@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-8882-6477>

Olga A. Gnusareva — researcher, Laboratory for diagnostics of bacterial infections, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, gnusarevao@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9044-1808>

Marina E. Mikhailova — researcher, Laboratory for diagnostics of bacterial infections, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, stavnipchi@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0000-3647-2550>

Alexandr N. Kulichenko — Dr. Sci. (Med.), Professor, Academician of RAS, Director, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia, kulichenko_an@list.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9362-3949>

Authors' contribution: *Siritsa Yu.V.* — laboratory research, research concept, writing the text of the article; *Ul'shina D.V., Vasilieva O.V.* — writing the text of the article; *Volynkina A.S.* — editing the article; *Gnusareva O.A., Mikhailova M.E.* — laboratory research; *Kulichenko A.N.* — research concept, editing articles. All authors confirm that their authorship meets the criteria of the International Committee of Medical Journal Editors, have 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 15.08.2025;
accepted for publication 20.10.2025;
published 31.10.2025



Подавление образования биоплёнок и выживания в эпителиальных клетках клинических изолятов уропатогенов при действии препарата Fluorothiazinone *in vitro*

Капотина Л.Н.¹, Моргунова Е.Ю.¹, Нелюбина С.А.¹, Федина Е.Д.¹,
Королёва Е.А.¹, Бондарева Н.Е.¹, Перепанова Т.С.², Зигангирова Н.А.^{1✉}

¹Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия;

²Научно-исследовательский институт урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина — филиал НМИЦ радиологии, Москва, Россия

Аннотация

Целью данного исследования было изучение влияния инновационного отечественного антибактериального препарата Fluorothiazinone, ингибитора системы секреции III типа и функционирования жгутика, на вирулентные свойства возбудителей инфекций мочевыводящих путей (ИМП).

Материалы и методы. Клинические изоляты видов *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* были получены от 4 пациентов с рецидивирующими инфекциями ИМП. Анализ цитотоксичности проводили на клетках HeLa с помощью набора «CytoTox 96». Жгутиковую подвижность бактерий оценивали в 0,25% агаре с измерением зоны подвижности. Биоплёнки культивировали в 96-луночных планшетах и окрашивали кристаллическим фиолетовым и Конго красным, оценивали структуру биоплёнок при микроскопировании и проводили количественную оценку бактериальной биоплёнки и экзополисахаридного матрикса при измерении оптической плотности связавшегося с биоплёнкой красителя. Внутриклеточное развитие изучали на клетках РС-3 при определении количества внутриклеточных бактерий методом высева лизатов клеток и иммунохимическим методом при окраске бактерий специфическими антителами.

Результаты. Препарат Fluorothiazinone специфически подавлял цитотоксичность и подвижность *E. coli* и *P. aeruginosa*. Для *K. pneumoniae* наблюдали чувствительность к препарату Fluorothiazinone, связанную с подавлением цитотоксичности. Для всех изученных изолятов было показано ингибирование образования биоплёнок на абиотической поверхности. Для *E. coli* и *K. pneumoniae* выявили достоверное снижение внутриклеточного размножения в клетках аденокарциномы простаты человека и подавление формирования внутриклеточных бактериальных сообществ.

Заключение. Препарат Fluorothiazinone нарушает механизмы, способствующие установлению персистенции патогенов при формировании хронических ИМП, среди которых образование биоплёнок на абиотических поверхностях, таких как катетеры, стенты, дренажи, и формирование внутриклеточных бактериальных сообществ и покоящихся внутриклеточных резервуаров.

Ключевые слова: Fluorothiazinone, кишечная палочка, синегнойная палочка, клебсиелла, антибиотики, инфекционные заболевания, внутриклеточные бактериальные сообщества, инфекции мочевыводящих путей, биоплёнки, жгутик, цитотоксичность

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном письменном согласии пациентов. Протокол клинического исследования № 07-ФТ-2024, РКИ № 513 от 30.10.2024.

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: Капотина Л.Н., Моргунова Е.Ю., Нелюбина С.А., Федина Е.Д., Королёва Е.А., Бондарева Н.Е., Перепанова Т.С., Зигангирова Н.А. Подавление образования биоплёнок и выживания в эпителиальных клетках клинических изолятов уропатогенов при действии препарата Fluorothiazinone *in vitro*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2025;102(5):547–559.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-723>

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

Original Study Article
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-723>

Suppression of biofilm formation and survival of clinical isolates of uropathogens within epithelial cells under the effect of Fluorothiazinone *in vitro*

Lydiya N. Kapotina¹, Elena Yu. Morgunova¹, Stanislava A. Nelyubina¹, Elena D. Fedina¹, Ekaterina A. Koroleva¹, Nataliya E. Bondareva¹, Tamara S. Perepanova², Naylia A. Zigangirova^{1✉}

¹National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia;

²N. Lopatkin Scientific Research Institute of Urology and Interventional Radiology — the branch of the National Medical Research Radiological Center, Moscow, Russia

Abstract

The aim of this study was to investigate the effect of the innovative Russian antibacterial drug Fluorothiazinone, an inhibitor of the type III secretion system and flagellar function, on the virulence properties of urinary tract infection (UTI) pathogens.

Materials and methods. Clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa* species were obtained from 4 patients with recurrent UTI. Cytotoxicity analysis was performed on HeLa cells using the CytoTox 96 kit. Bacterial flagellar motility was assessed in 0.25% agar by measuring the zone of motility. Biofilms were cultivated in 96-well plates and stained with crystal violet and Congo red. Biofilm structure was assessed by microscopy, and the bacterial biofilm and exopolysaccharide matrix were quantified by measuring the optical density of the dye bound to the biofilm. Intracellular development was studied in PC-3 cells by determining the number of intracellular bacteria using a cell lysate plating method and an immunochemical method involving staining the bacteria with specific antibodies.

Results. The Fluorothiazinone antibacterial specifically inhibited the cytotoxicity and motility of *E. coli* and *P. aeruginosa*. For *K. pneumoniae*, susceptibility to Fluorothiazinone was observed, associated with the suppression of cytotoxicity. For all the isolates studied, inhibition of biofilm formation on an abiotic surface was demonstrated. For *E. coli* and *K. pneumoniae*, a significant decrease in intracellular replication within human prostate adenocarcinoma cells and suppression of intracellular bacterial community formation were observed.

Conclusion. Fluorothiazinone disrupts mechanisms that contribute to pathogen persistence in the formation of chronic UTI, including biofilm formation on abiotic surfaces such as catheters, stents, and drains, and the formation of intracellular bacterial communities and dormant intracellular reservoirs.

Keywords: Fluorothiazinone, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella*, antibiotics, infectious diseases, intracellular bacterial communities, urinary tract infections, biofilms, flagellum, cytotoxicity

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol of a clinical trial No. 07-FT-2024, RCT No. 513 dated 10/30/2024.

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: Kapotina L.N., Morgunova E.Yu., Nelyubina S.A., Fedina E.D., Koroleva E.A., Bondareva N.E., Perepanova T.S., Zigangirova N.A. Suppression of biofilm formation and survival of clinical isolates of uropathogens within epithelial cells under the effect of Fluorothiazinone *in vitro*. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(5):547–559.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-723>
EDN: <https://www.elibrary.ru/KFAYZJ>

Введение

Рецидивы инфекции мочевыводящих путей (ИМП) характеризуются повторным возникновением острой бактериальной инфекции, вызванной тем же возбудителем. Обычно рецидивирующие ИМП (рИМП) определяются как 2 и более случая неосложнённой ИМП за последние 6 мес или 3 случая и более за 12 мес [1–4]. Ежегодно от рИМП страдают 5–10% взрослых женщин [5], что влияет

на затраты по лечению и снижает качество жизни, особенно с учётом того, что более чем у 60% женщин ИМП диагностируется хотя бы раз в жизни [6, 7]. Возбудителем большинства ИМП является уропатогенная *Escherichia coli* (УРЕС) [8–10]. Однако на 2-е место среди этиологических агентов рИМП в последнее время выходит *Klebsiella pneumoniae* [11, 12]. Эта грамотрицательная бактерия стала распространённым патогеном, ответственным как за

внебольничные, так и за внутрибольничные ИМП, особенно у лиц с факторами риска развития инфекции, ослабленным иммунитетом и хроническими сопутствующими заболеваниями [13–15].

Для возбудителей ИМП характерен достаточно сложный механизм развития инфекции в мочевом пузыре, когда бактерии после адгезии к рецепторам слизистой оболочки мочевого пузыря вызывают воспалительную реакцию и проникают в уротелий, образуя внутриклеточные бактериальные сообщества (ВБС) [16, 17]. Внутриклеточные УРЕС проходят несколько стадий в своем развитии: инвазия, формирование ВБС, созревание ВБС и формирование покоящихся внутриклеточных резервуаров. ВБС представляет собой транзитное бактериальное состояние, которое сохраняется до тех пор, пока бактерии не размножатся и не выйдут из клеток хозяина. Покоящиеся внутриклеточные резервуары формируются в более глубоких слоях уротелия. Бактерии, способные образовывать ВБС и покоящиеся внутриклеточные резервуары, могут уклоняться от фагоцитоза, выживать внутри клеток хозяина, защищенные от воздействия антибиотиков и иммунных факторов. Они образуют резервуары персистирующих патогенов в мочевыводящих путях и периодически вызывают рИМП.

Одним из значимых факторов при развитии рИМП является катетеризация мочевого пузыря. На долю катетер-ассоциированных инфекций приходится до 40% всех внутрибольничных инфекций [18]. Риск инфекции при кратковременной катетеризации (до 7 дней) составляет до 10% и возрастает на 3–7% каждый день продолжения катетеризации [19]. При длительной катетеризации (более 30 дней) бактериурия развивается почти у 100% пациентов [18]. У пациентов с катетер-ассоциированными ИМП образование биопленок на поверхностях катетеров, стентов, дренажей и т. п. является фактором развития уросепсиса и приводит к значительным осложнениям течения инфекции и неэффективности лечения [20].

рИМП во многом также связаны с ростом антибиотикорезистентности уропатогенов. Антибиотики остаются основой лечения и профилактики рИМП — около 25% рецептов на антибиотики выдаются при ИМП [21]. Более широкое использование антибиотиков во всём мире и длительное использование антибиотиков в профилактических целях или частое применение комбинаций различных антибиотиков у пациентов с рИМП могут способствовать развитию дальнейшей резистентности. Накопление устойчивых форм бактерий может развиваться в течение нескольких недель. Так, *E. coli*, устойчивая по меньшей мере к 4 антибиотикам, была идентифицирована в фекальных изолятах более чем у 90% пациентов, получавших профилактическое лечение низкими дозами антибиотиков в течение 2 нед [22].

Выявление особенностей сложного взаимодействия уропатогенов с организмом хозяина необходимо как для более глубокого понимания патогенеза рИМП, так и для выбора новых подходов лечения этих широко распространённых бактериальных инфекций.

Цель работы — изучить действие инновационного отечественного антибактериального препарата Fluorothiazinone (ФТ; НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, РУ ЛП-№(005077)-(РГ-RU)) на вирулентные свойства изолятов, полученных из мочи пациентов с хроническими ИМП.

Материалы и методы

Бактериальные изоляты

Клинические изоляты *K. pneumoniae* 5811, 5672, *Pseudomonas aeruginosa* 5595, *E. coli* 5424/1 были выделены из мочи 4 взрослых пациентов обоего пола разных возрастных групп, госпитализированных в НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина — филиал НМИЦ радиологии Минздрава России с клиническими признаками ИМП. Изоляты из мочи были собраны в рамках проведения клинического исследования по Протоколу 07-ФТ-2024, РКИ № 513 от 30.10.2024 г.

Культивирование бактерий

Видовую принадлежность бактерий подтверждали с помощью высевов на плотные питательные среды: LB-агар («BD Difco»), цетримидный агар («HiMedia») с последующим анализом белкового профиля единичных колоний на приборе «Bruker MALDI Biotyper» («Beckman Coulter Diagnostics»).

Клинические уропатогенные изоляты выращивали в течение 18 ч при 37°C в бульоне Лурия–Бертани (LB-бульоне) с непрерывной аэрацией на шейкере (240 об/мин) до концентрации 10^9 микробных клеток/мл, что оценивали по стандарту МакФарланда на денситометре «Densi-La-Meter II» («ERBA Lachema»). Полученную бактериальную суспензию разводили до нужных концентраций в свежем LB-бульоне.

Исследуемый препарат

В работе использовали активную фармацевтическую субстанцию ФТ.

Для изучения действия ФТ на подвижность и формирование биопленок клиническими изолятами использовали исходный раствор с концентрацией 2 мг/мл в 0,3 М CH_3COONa буфере pH $7,0 \pm 0,2$. Раствор готовили следующим образом: к навеске субстанции ФТ массой 0,021 г добавляли раствор из 0,120 г гидроксида натрия в 10 мл дистиллированной воды. Далее смесь перемешивали на магнитной мешалке до полного растворения кристаллов ФТ, подкисляли ледяной уксусной кислотой до pH 7–8.

Образовавшийся раствор фильтровали через шприцевую насадку 0,22 мкм в стерильную пробирку. В тестах использовали препарат в конечной концентрации 100 мкг/мл.

Для изучения цитотоксичности и внутриклеточного выживания бактерий использовали раствор ФТ в диметилсульфоксиде в концентрации 10 мг/мл, конечная концентрация ФТ в среде составила 20 мкг/мл.

Анализ цитотоксичности

Анализ цитотоксичности проводили согласно методике [23] с некоторыми изменениями. Суточный монослой клеток HeLa (cervical carcinoma cells, ATCC CCL-2™), выращенный в культуральной среде IMDM («БиолоТ») с 10% эмбриональной телячьей сыворотки («HyClone») без добавления антибиотиков, 1×10^5 клеток на лунку инфицировали бактериальной культурой при множественности заражения (MOI) 10 и 50. ФТ в концентрации 20 мкг/мл добавляли сразу после внесения бактериальной культуры и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 20 ч. Планшеты центрифугировали в течение 20 мин при 1500 об/мин.

В супернатантах определяли активность высвобожденной лактатдегидрогеназы (ЛДГ) с помощью набора для анализа нерадиоактивной цитотоксичности «CytoTox 96» («Promega»). ЛДГ — цитозольный фермент, присутствующий в ядерных клетках, высвобождается во внеклеточную среду после разрушения клеточной мембраны. Процент высвобождения ЛДГ рассчитывали относительно неинфицированного контроля (0% высвобождения ЛДГ) и клеток HeLa, лизированных Triton X-100 (100% высвобождения ЛДГ). ЛДГ в бактериальных культурах в среде без монослоя клеток не выявлялась.

Плавательная подвижность

Для оценки плавательной подвижности бактерий культуры выращивали в течение 18 ч при 37°C с аэрацией на шейкере (240 об/мин), разводили в 100 раз LB-бульоном и культивировали в течение 3 ч при условиях, указанных выше. Инокулировали 2 мкл в толщу 0,25% агара, содержащего 1% триптона и 0,5% NaCl, в чашках Петри диаметром 90 мм. Наблюдали в течение 48 ч. Подвижность бактерий оценивали по диаметру зоны миграции бактерий от центра чашки. Эти значения служили положительными контролями при оценке подвижности бактерий.

Для оценки действия ФТ на подвижность клинических изолятов использовали раствор ФТ в ацетатном буфере в концентрации 100 мкг/мл. Для этого в приготовленный 0,25% агар, охлажденный до 45–50°C, вносили раствор ФТ, хорошо перемешивали и разливали по чашкам Петри. После застыва-

ния агара бактериальную культуру вносили в толщу агара в объеме 2 мкл. Образцы культивировали при 30°C во влажной камере в течение 48 ч. Действие ФТ оценивали по диаметру зоны движения бактерий. Изоляты с зоной подвижности менее 10 мм за 48 ч классифицировались как неподвижные, а с зоной более 10 мм — как подвижные. В контрольные чашки вносили ацетатный буфер без ФТ.

Биоплёнокообразование

Изучение способности изолятов к образованию биоплёнок проводили модифицированным методом G.A. O'Toole и соавт. [24]. Культивирование биоплёнки проводили в микротитрационных 96-луночных полистироловых планшетах с ТС-обработкой («Corning 3599»). Бактериальные культуры выращивали в LB-бульоне при 37°C в течение ночи на шейкере при 240 об/мин. Ночные культуры разводили до $\approx 10^7$ КОЕ/мл стерильным LB-бульоном с добавлением раствора ФТ в ацетатном буфере в конечной концентрации 100 мкг/мл, вносили в лунки планшета по 200 мкл. В лунки, выбранные в качестве положительного контроля, препарат не добавляли. В качестве отрицательного контроля в лунки вносили стерильный LB-бульон.

Планшеты стационарно инкубировали при 37°C в течение 48 ч. После инкубации содержимое лунок отбирали и трижды промывали 200 мкл стерильного фосфатно-солевого буфера, высушивали на воздухе и фиксировали 96% этанолом в течение 15 мин, затем удаляли этанол, лунки промывали и просушивали.

Окрашивание проводили двумя методами: в течение 15 мин 0,1% кристаллическим фиолетовым («Merck») или в течение 30 мин 0,1% Конго красным («Merck»). По истечении указанного времени краситель отбирали из лунок, промывали дистиллированной водой и высушивали на воздухе. Для количественного анализа связавшиеся с биоплёнкой красители экстрагировали 200 мкл 96% этанола, экстракт переносили в лунки чистого планшета.

Оптическую плотность измеряли с помощью спектрофотометра «Multiskan EX» («Thermo Scientific») при длине волны 540 нм для красителя кристаллический фиолетовый и 492 нм — для Конго красного. Для изучения структуры биоплёнки окрашивание проводили аналогично, лунки промывали и тщательно высушивали на воздухе, затем планшеты изучали под световым микроскопом («Nikon Eclipse 50i», «Nikon») при увеличении 200. Для каждого изолята были выполнены 3 параллельных эксперимента по 3 повтора.

Интернализация и выживаемость бактерий в клетках PC-3

В работе использовали клеточную линию PC-3 (клетки аденокарциномы простаты человека, ATCC

CRL-1435). Клетки инкубировали в клеточной среде RPMI-1640 («БиолоТ»), дополненной 10% эмбриональной телячьей сывороткой («HyClone») без добавления антибиотиков, при 37°C с 5% CO₂ в течение 24 ч. Количество клеток определяли с помощью счётчика клеток «Scepter 2.0» («Millipore»).

Клинические изоляты выращивали в течение 18 ч при 37°C в LB-бульоне с непрерывной аэрацией на шейкере (240 об/мин) до концентрации 10⁹ микробных клеток/мл.

Суточный монослой клеток РС-3, выращенный в 24-луночном культуральном планшете со стерильными круглыми стёклами диаметром 12 мм, инфицировали бактериальной культурой. Дозы заражения для внутриклеточной модели отбирали на основании полученных результатов по цитотоксичности клинических изолятов.

Для оценки инвазии клетки с бактериями инкубировали 1 ч, после чего клетки трижды промывали средой для удаления неприкрепившихся бактерий и инкубировали в течение 1 ч при 37°C и 0,5% CO₂ в среде, содержащей гентамицин («Gibco»), для уничтожения внеклеточных бактерий. Концентрация гентамицина была определена по минимальной подавляющей концентрации (МПК) для каждого изолята. Клетки трижды промывали для удаления гентамицина. Для определения количества бактерий клетки РС-3, заражённые бактериальными культурами, лизировали 0,25% Triton X-100 («Sigma») в течение 10 мин при комнатной температуре. В качестве отрицательного контроля использовали незаражённые клетки РС-3. Далее производили высева лизатов на цетримидный или LB-агар (в зависимости от вида исследуемого изолята) методом серийных разведений. Количество внутриклеточных бактерий выражали в КОЕ/мл. Рассчитывали среднее значение из бактериальной популяции 2 лунок в 3 экспериментах.

Для оценки начала внутриклеточного размножения монослой клеток культивировали 4 ч и проводили все процедуры удаления внеклеточных бактерий и высева аналогично описанным выше.

Внутриклеточное выживание бактерий в клетках РС-3 оценивали через 24 ч после заражения бактериальной культурой. При этом через 4 ч после заражения клетки инкубировали с гентамицином 1 ч для уничтожения внеклеточных бактерий. Далее планшет трижды промывали для удаления гентамицина и вносили свежую питательную среду с поддерживающей концентрацией гентамицина. Все процедуры удаления внеклеточных бактерий и высева проводили аналогично описанным выше.

Для изучения действия ФТ раствор ФТ в диметилсульфоксиде вносили в культуральную среду в концентрации 20 мкг/мл на разных сроках эксперимента: за 1 ч до заражения, в момент заражения клеток, через 2 и 5 ч после заражения и отмывки

от гентамицина с дальнейшей инкубацией в присутствии ФТ в течение 24 ч от момента заражения.

Для проведения микроскопического анализа клетки фиксировали ацетоном и окрашивали мышинными поликлональными антителами (антитела были получены к каждому изоляту) в течение 30 мин при 37°C и 5% CO₂ и антимышиным конъюгатом IgG-FITC («Merck») в течение 30 мин при 37°C и 5% CO₂. Образцы анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа «Nikon Eclipse 50i» («Nikon») при увеличении 1000.

Статистический анализ

Статистическую обработку результатов анализа и визуализации при исследовании бактерий *in vitro* выполняли с помощью «GraphPad Prism v. 8.4.3» («GraphPad Software»). Данные опытных и контрольных групп сравнивали с использованием t-критерия Стьюдента. Критерием статистической достоверности различия получаемых данных считали величину ошибки $p < 0,05$. Все эксперименты проводили в 3 повторах.

Результаты

Характеристика клинических изолятов

Анализ на чувствительность исследуемых клинических изолятов к антибиотикам выполнен в клинко-диагностической лаборатории НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина — филиала НМИЦ радиологии Минздрава России, результаты представлены в **таблице**.

ФТ не влияет на жизнеспособность клинических изолятов

Действие ФТ на жизнеспособность бактерий оценивали методом культивирования в питательном LB-бульоне в присутствии ФТ в концентрациях 60, 80 и 100 мкг/мл в течение 24 ч с непрерывной аэрацией на шейкере (240 об/мин) и определением КОЕ методом высева. В соответствии с механизмом действия и, как ранее было показано для бактерий разных видов, ФТ не влиял на жизнеспособность изучаемых клинических изолятов.

ФТ подавляет цитотоксичность клинических изолятов

Оба изолята *K. pneumoniae* характеризовались выраженной цитотоксичностью. Для изолята *K. pneumoniae* 5811 цитотоксичность при MOI 10 составила 65%, при MOI 50 — 78%. Для изолята *K. pneumoniae* 5672 цитотоксичность при MOI 10 была 70%, при MOI 50 — 76%.

Цитотоксичность изолятов *P. aeruginosa* 5595 и *E. coli* 5424/1 на клеточной линии Hela была менее выражена. При MOI 10 цитотоксичность изолята *P. aeruginosa* 5595 составила 50%, при MOI 50 —

Значения МПК АБП в отношении исследуемых клинических изолятов

Антибиотикограмма для выделенных микроорганизмов	<i>E. coli</i> 5424/1		<i>P. aeruginosa</i> 5595		<i>K. pneumoniae</i> 5811		<i>K. pneumoniae</i> 5672	
	качест- венный результат	МПК, мг/л	качест- венный результат	МПК, мг/л	качест- венный результат	МПК, мг/л	качест- венный результат	МПК, мг/л
Амикацин	S	≤ 8	S		S	≤ 8	S	≤ 8
Амоксициллин/клавулановая кислота	R		R		R			
Ампициллин	R	> 16	R		R	> 16	R	> 16
Ампициллин/сульбактам					R			
Гентамицин	R	128	R	16	R	512	S	≤ 2
Имипенем	S	≤ 0,25	S		R	> 8	S	≤ 0,5
Колистин					R			
Левифлоксацин			S		R	> 2	R	> 4
Меропенем	S	≤ 0,125	S		R	> 8	I	8
Нитрофурантоин			R					
Пиперацillin/тезобактам	S	≤ 4/4	S		R		S	≤ 4/4
Тигециклин	S	≤ 1	R					
Тобрамицин	S	≤ 2	S				S	≤ 2
Триметоприм/сульфаметоксазол	S	≤ 2/38			I		S	≤ 2/38
Фосфомицин с глюкозо-6-фосфатом	S	≤ 16					S	≤ 16
Цефазолин	R	> 32	R		R	> 32	R	> 32
Цефепим			S		R	> 8		
Цефтазидим			R		R	> 8	R	> 16
Цефтриаксон	S	≤ 1	R		R	> 4	R	> 4
Цефуросксим					R	> 16		
Ципрофлоксацин	S	≤ 0,25			R	> 1	R	> 1
Эртапенем	S	≤ 0,25	R		R	> 1	R	> 2

Примечание. S — чувствительный; R — резистентный, устойчивый; I — промежуточный.

61%. Для изолята *E. coli* 5424/1 — 38 и 60% при MOI 10 и MOI 50 соответственно.

В присутствии ФТ в концентрации 20 мкг/мл цитотоксичность через 20 ч культивирования достоверно снижалась при MOI 10 и MOI 50 для всех 4 клинических изолятов в 1,5–2,0 раза.

ФТ подавляет плавательную подвижность

В полужидкой среде бактериальные клетки способны к плавательной подвижности, перемещаясь за счёт жгутиков. *K. pneumoniae* относится к бактериям, которые не обладают плавательной подвижностью за счёт жгутиков. В связи с этим действие ФТ на плавательную активность оценивали для 2 уropатогенных изолятов: *P. aeruginosa* 5595 и *E. coli* 5424/1.

Установлено, что оба клинических изолята обладают плавательной подвижностью. В присутствии ФТ в концентрации 100 мкг/мл в среде культивирования наблюдалось выраженное подавление подвижности, связанной с активностью жгутика (рис. 1).

Диаметр зоны распространения бактерий в полужидком агаре для *P. aeruginosa* 5595 за 48 ч соста-

вил 65–67 мм, в присутствии ФТ — 25–27 мм. Для изолята *E. coli* 5424/1 диаметр зоны подвижности за 48 ч составил 35–37 мм, в присутствии ФТ зона уменьшилась до 12–14 мм. В контрольных чашках с ацетатным буфером без добавления ФТ подвижность не ингибировалась. Тем самым для ФТ было показано подавление подвижности, связанной с работой жгутика.

ФТ подавляет образование биоплёнок

Способность к формированию биоплёнок и влияние ФТ на этот процесс оценивали для 4 изолятов. Количественную оценку плотности биоплёнки проводили при окрашивании бактерий кристаллическим фиолетовым. Через 48 ч изолят *P. aeruginosa* 5595 формировал интенсивную многоуровневую зрелую биоплёнку, изоляты *K. pneumoniae* 5672 и *E. coli* 5424/1 формировали плотный монослой с участками многоуровневой структуры, изолят *K. pneumoniae* 5811 демонстрировал наименьшую скорость образования биоплёнки: к 48 ч наблюдали образование монослоя с формированием микроколоний.

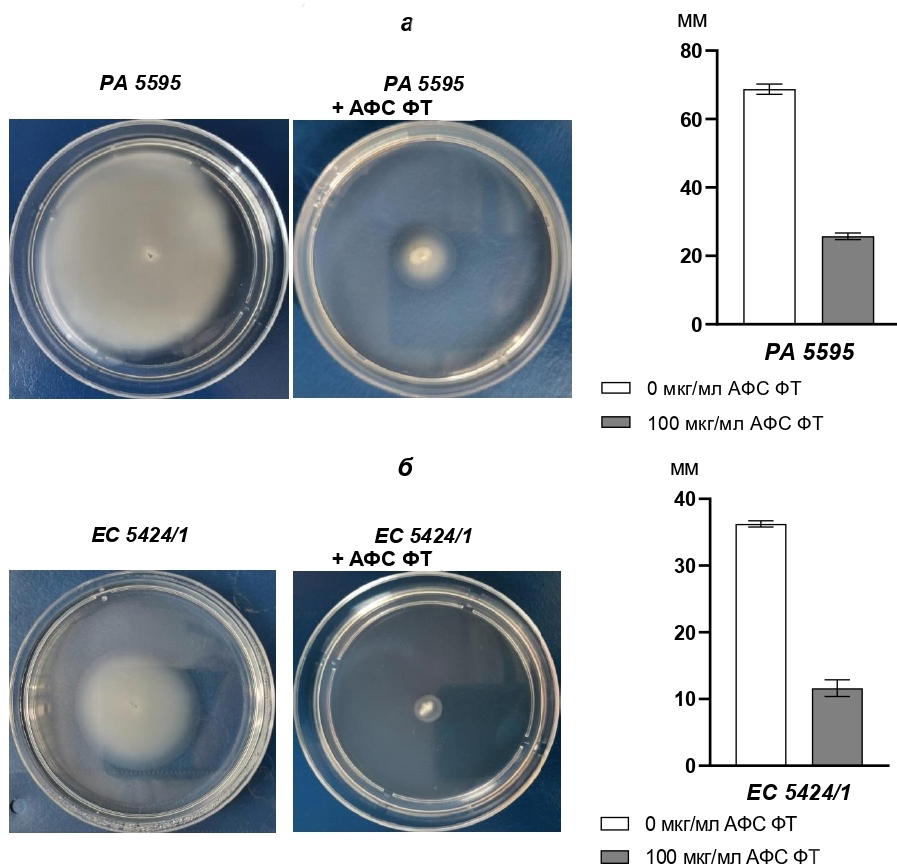


Рис. 1. Подавление плавательной подвижности изолятов через 48 ч инкубации в присутствии ФТ.

Репрезентативные изображения плавательной подвижности на чашках Петри и оценка изменения диаметра зоны подвижности *P. aeruginosa* 5595 (а) и *E. coli* 5424/1 (б) в присутствии ФТ в концентрации 100 мкг/мл. Планки погрешностей представляют собой SD 2 повторов.

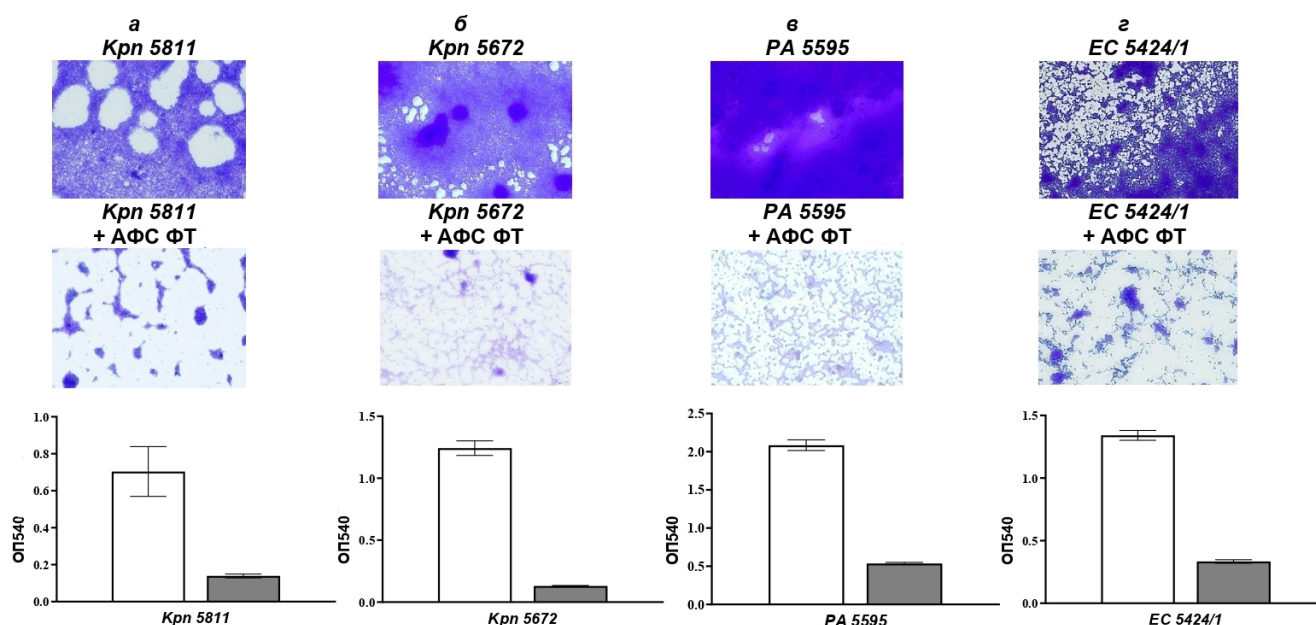


Рис. 2. ФТ изменяет структуру и биомассу биоплёнки изолятов *K. pneumoniae* 5811 (а), *K. pneumoniae* 5672 (б), *P. aeruginosa* 5595 (в) и *E. coli* 5424/1 (г).

Представлены микрофотографии фрагментов сформированной биоплёнки контрольных и опытных образцов с добавлением ФТ в концентрации 100 мкг/мл через 48 ч инкубации. Накопление биомассы биоплёнки оценивали по степени окрашивания кристаллическим фиолетовым при оптической плотности 540 нм.

Добавление ФТ одновременно с внесением бактериальной культуры приводило к достоверному снижению плотности биоплёнки и нарушению её структуры. Все изоляты под действием ФТ формировали на абиотической поверхности разреженный монослой с ячеистой структурой, однако не происходило формирования микроколоний и созревания биоплёнки (**рис. 2**).

При количественной оценке бактериальной плотности биоплёнки под действием ФТ установлено достоверное снижение количества бактерий в составе биоплёнки: максимальное подавление (на 85%) — для *K. pneumoniae* 5672, 79% — для *E. coli* 5424/1, 75% — для *P. aeruginosa* 5595, 71% — для *K. pneumoniae* 5811 (**рис. 2**).

Оценку формирования экзополисахаридного матрикса (ЭПМ) биоплёнки проводили при окрашивании Конго красным. Выявлено, что все изученные изоляты способны формировать ЭПМ, однако биоплёнка *K. pneumoniae* 5811 характеризовалась наименьшей интенсивностью ЭПМ. Под действием ФТ все изоляты утрачивали способность к биосинтезу ЭПМ (**рис. 3**).

При количественной оценке показано достоверное снижение формирования ЭПМ для всех изолятов: *K. pneumoniae* 5811 — на 76%, *K. pneumoniae* 5672 —

на 74%, *P. aeruginosa* 5595 — на 70%, *E. coli* 5424/1 — на 67% (**рис. 3**). Растворитель без содержания ФТ не оказывал влияния на формирование биоплёнки.

Таким образом, все исследованные изоляты способны формировать биоплёнку на абиотической поверхности, а ФТ подавлял формирование зрелой биоплёнки.

ФТ подавляет инвазию и внутриклеточное размножение уропатогенов

Возможность формирования ВБС изучаемыми уропатогенными изолятами оценивали на модели клеточной линии РС-3 (клетки аденокарциномы простаты человека) при заражении изолятами и наблюдении на этапе инвазии и внутриклеточного размножения через 4 и 24 ч. Для оценки действия ФТ на эти процессы препарат вносили за 1 ч до заражения, одновременно с заражением, а также после смены среды (через 2 и 5 ч).

Количество жизнеспособных внутриклеточных бактерий оценивали путём посева разведений лизата клеток после удаления внеклеточных бактерий обработкой гентамицином в течение 1 ч. Параллельно анализировали монослой клеток микроскопированием после окрашивания специфическими антибактериальными антителами.

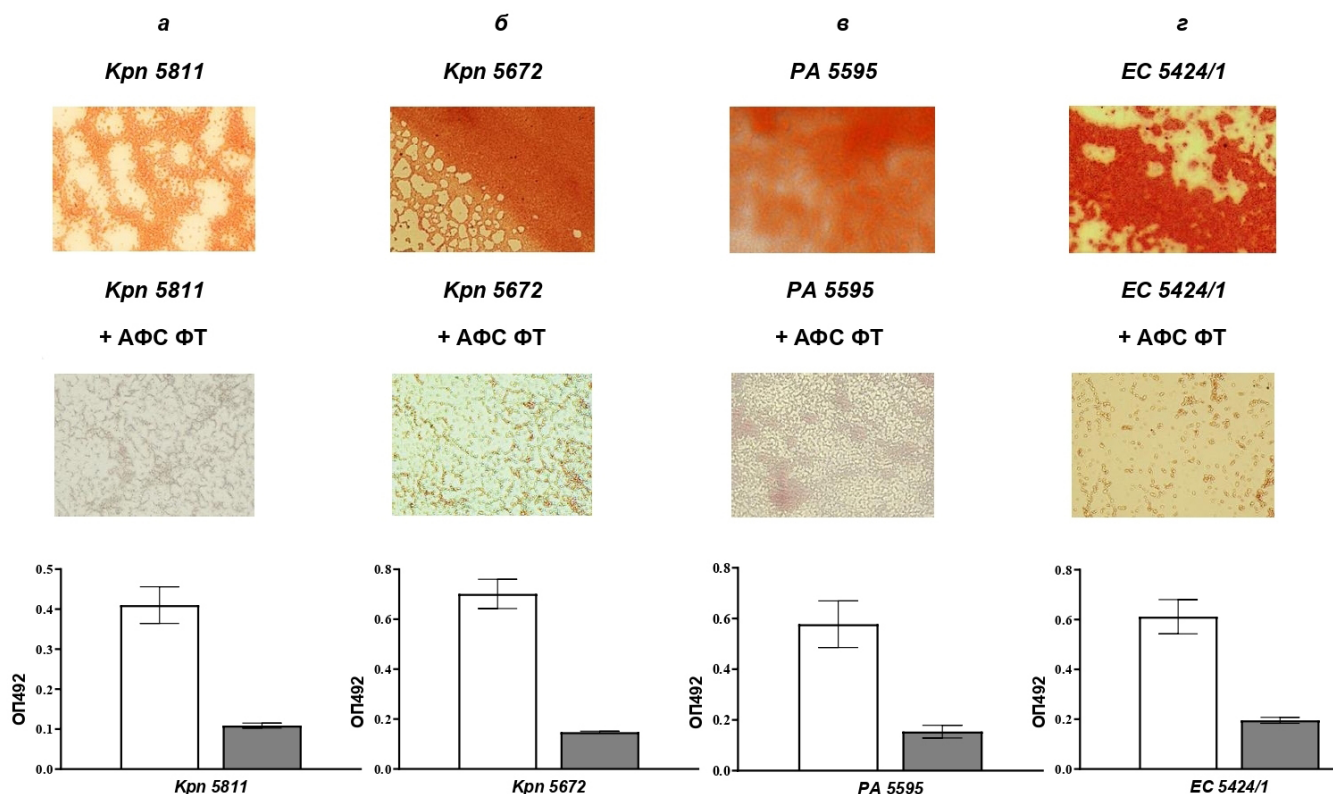


Рис. 3. ФТ ингибирует продукцию ЭПМ биоплёнки изолятов *K. pneumoniae* 5811 (а), *K. pneumoniae* 5672 (б), *P. aeruginosa* 5595 (в) и *E. coli* 5424/1 (г).

Представлены микрофотографии фрагментов ЭПМ биоплёнки контрольных и опытных образцов с добавлением ФТ в концентрации 100 мкг/мл через 48 ч инкубации. Продукцию ЭПМ биоплёнкой оценивали по степени окрашивания матрикса Конго красным при оптической плотности 492 нм.

Для изолята *E. coli* 5424/1 при заражении использовали дозу $1,5 \times 10^6$ КОЕ/мл, что составило МОИ 55. Через 1 ч инвазия составила 0,47%, а при действии ФТ — 0,053%. Через 4 ч количество внутриклеточных бактерий в контроле составило $2,1 \times 10^5$ КОЕ/мл, а в присутствии ФТ на порядок меньше — $1,1 \times 10^4$ КОЕ/мл. Через 24 ч наблюдали увеличение количества *E. coli* 5424/1 до $2,4 \times 10^6$ КОЕ/мл в контрольных образцах при значительном снижении размножения бактерий в присутствии ФТ до $7,5 \times 10^2$ КОЕ/мл.

На микрофотографиях монослоя заражённых клеток в контрольных образцах уже через 4 ч выявлялись внутриклеточные конгломераты клеток, которые к 24 ч формировали типичные ВБС. В присутствии ФТ ВБС практически не выявлялись (рис. 4).

Для изолята *K. pneumoniae* 5811 также наблюдали формирование ВБС и подавление их образования

в присутствии ФТ. Этот изолят показал более низкие значения инвазивности, которая составила для контроля 0,005%, при этом при действии ФТ наблюдали практически близкие показатели инвазивности. Для этого изолята установлено эффективное внутриклеточное размножение: через 4 ч количество внутриклеточных бактерий составило $5,0 \times 10^5$ КОЕ/мл, через 24 ч — $2,0 \times 10^6$ КОЕ/мл. При действии ФТ наблюдали подавление размножения бактерий — $5,9 \times 10^2$ КОЕ/мл через 24 ч. Ингибирование формирования ВБС в присутствии ФТ наглядно продемонстрировано на микрофотографиях (рис. 5).

Обсуждение

Установление диагноза ИМП, под которым могут маскироваться и инфекционно-воспалительные заболевания, и бессимптомная бактериурия, иногда трудно распознать, особенно при рецидивирующем течении, из-за сложного механизма

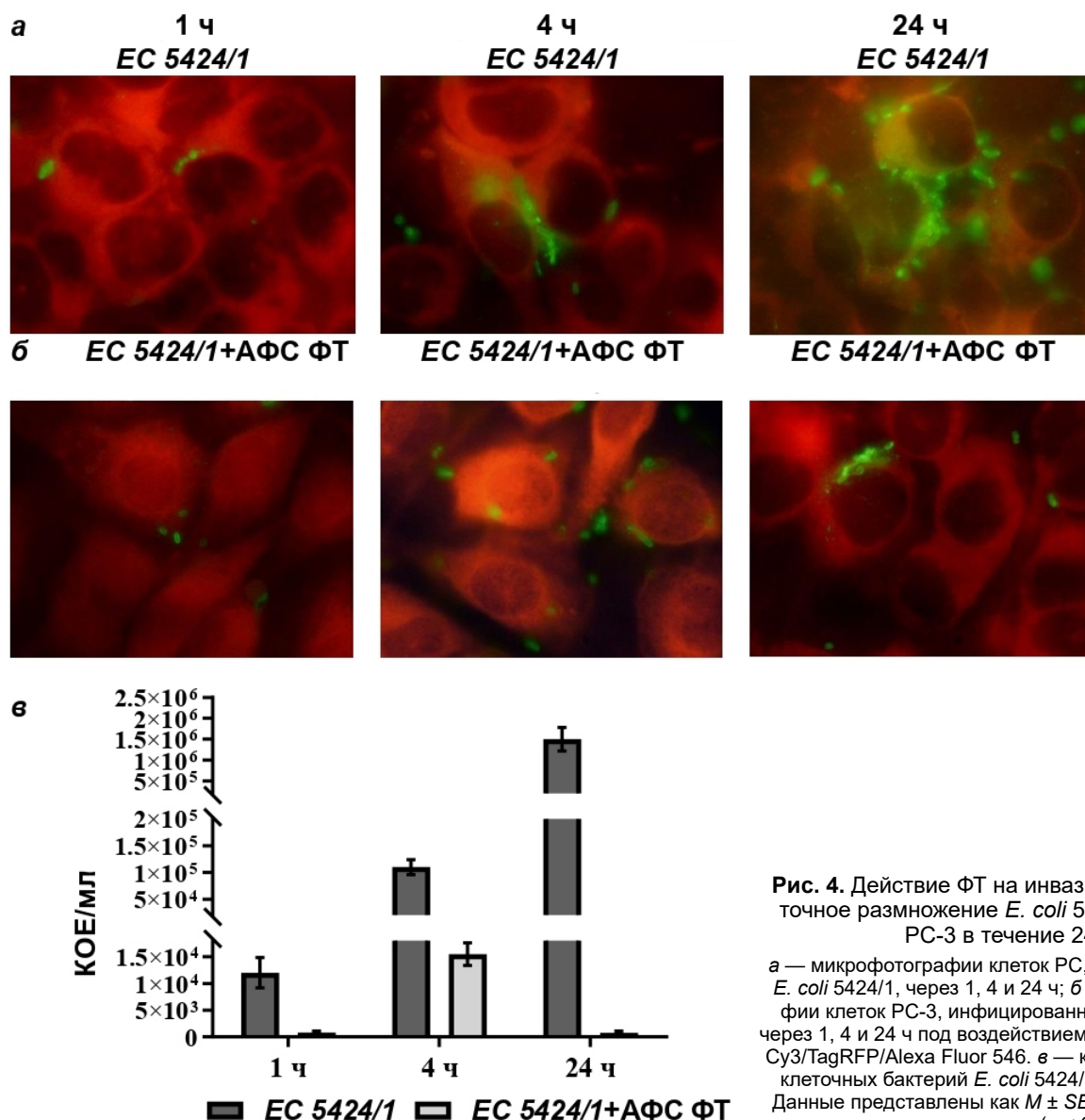


Рис. 4. Действие ФТ на инвазию и внутриклеточное размножение *E. coli* 5424/1 в клетках РС-3 в течение 24 ч.

а — микрофотографии клеток РС, инфицированных *E. coli* 5424/1, через 1, 4 и 24 ч; б — микрофотографии клеток РС-3, инфицированных *E. coli* 5424/1, через 1, 4 и 24 ч под воздействием ФТ. Фильтр TRITC/ Cy3/TagRFP/Alexa Fluor 546. в — количество внутриклеточных бактерий *E. coli* 5424/1 в клетках РС-3. Данные представлены как $M \pm SEM$ 3 независимых экспериментов ($p < 0,05$).

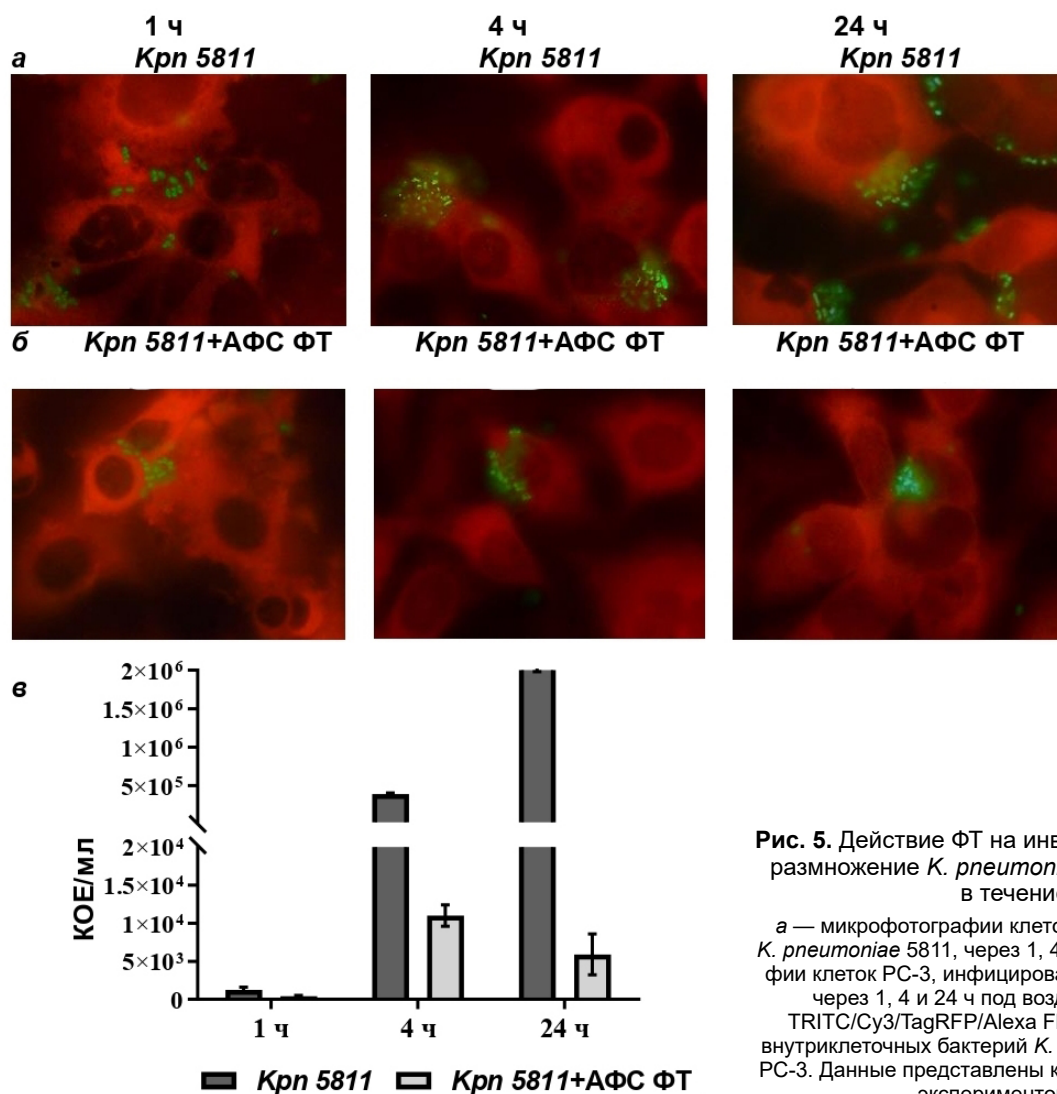


Рис. 5. Действие ФТ на инвазию и внутриклеточное размножение *K. pneumoniae* 5811 в клетках PC-3 в течение 24 ч.

а — микрофотографии клеток PC-3, инфицированных *K. pneumoniae* 5811, через 1, 4 и 24 ч; **б** — микрофотографии клеток PC-3, инфицированных *K. pneumoniae* 5811, через 1, 4 и 24 ч под воздействием ФТ. Фильтр TRITC/Cy3/TagRFP/Alexa Fluor 546. **в** — количество внутриклеточных бактерий *K. pneumoniae* 5811 в клетках PC-3. Данные представлены как $M \pm SEM$ 3 независимых экспериментов ($p < 0,05$).

взаимодействия уропатогенов с тканями мочевыводящих путей и иммунной системой организма. Международными руководствами рекомендовано ориентироваться только на клинические симптомы заболевания [1]. Несмотря на то что ИМП вызывают патогены различных таксономических групп, и в большей степени эти бактерии являются внеклеточными, тем не менее они используют общую стратегию развития инфекционного процесса: эффективную адгезию, инвазию в эпителиальные клетки и формирование резервуаров патогенов в виде ВБС, покоящихся внутриклеточных резервуаров или поверхностных (на катетерах, инородных телах) биоплёнок. Такая стратегия позволяет уходить от действия антибактериальных препаратов и факторов иммунитета хозяина, что и определяет клиническую и эпидемиологическую актуальность рецидивирующих ИМП.

Новые подходы к лечению таких хронических инфекций должны основываться на понимании механизмов патогенеза и специфическом блокировании звеньев этого механизма. В нашей работе

мы оценивали действие активной фармацевтической субстанции антибактериального препарата ФТ на проявление вирулентных свойств клинических изолятов 3 различных видов: *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *E. coli* в условиях *in vitro*.

ФТ — оригинальный отечественный антибактериальный препарат, отличающийся от антибиотиков по механизму действия, т. к. он не убивает бактерии, а подавляет их вирулентность. Для ФТ показано специфическое блокирование системы секреции III типа (ССТТ), которая ответственна за продукцию токсинов, разрушающих иммунные клетки и способствующих внутриклеточному выживанию бактерий. ФТ ингибирует также жгутиковую подвижность бактерий и образование биоплёнок. Подавление вирулентности приводило к блокированию инфекционного процесса в организме хозяина, что было показано в экспериментах на животных [25–27]. ФТ эффективен в отношении устойчивых к разным классам антибиотиков бактерий, т. к. мишень действия присутствует вне зависимости от наличия детерминант резистентности [28].

В клинических исследованиях на пациентах с острой ИМП установлено, что ФТ в 10 раз снижал развитие рецидивов через 2 и 3 мес после окончания терапии по сравнению с цефепимом, что можно объяснить эффективной эрадикацией уропатогенов в их резервуарах, в том числе внутриклеточных [29].

Известно, что *P. aeruginosa* и *E. coli* секретируют цитотоксины прямо в эукариотические клетки посредством ССТТ. В связи с этим мы оценивали действие ФТ на цитотоксичность этих изолятов. Для *K. pneumoniae* не показано наличие ССТТ, но описан цитотоксический эффект, связанный с наличием капсульного полисахарида [30].

Для всех проанализированных изолятов, которые характеризовались значительной токсичностью в отношении эпителиальных клеток, показано достоверное подавление гибели клеток в присутствии ФТ.

Наряду с ССТТ мишенью ФТ является жгутик, имеющий близкую структуру в базальной части органеллы. Для подвижных изолятов *P. aeruginosa* и *E. coli* наблюдали практически полное блокирование работы жгутика, которое выражалось в отсутствии зоны распространения в полужидком агаре. При этом нужно отметить, что рост бактерий в присутствии ФТ не подавлялся, что было показано в предварительных экспериментах.

Наличие у уропатогенов поверхностных структур, таких как пили, фимбрии и жгутики, способствует адгезии к рецепторам уротелия как первому этапу колонизации мочевого пузыря и, таким образом, являющихся важной мишенью для подавления развития инфекции. Одним из примеров подтверждения эффективности такого подхода, связанного с блокированием адгезии, является применение D-маннозы в клиническом исследовании, которое показало достоверное снижение вероятности развития рецидива при ИМП [31].

Таким образом, показанное при действии ФТ подавление подвижности бактерий, связанное с работой жгутиков, направлено на блокирование первого этапа развития инфекции — этапа колонизации уротелия.

Ключевым звеном развития хронического инфекционного процесса, имеющего рецидивирующее течение и обусловленного длительной персистенцией патогенов, является способность бактерий к активной инвазии в клетки уротелия и образованию внутриклеточных биоплёнокподобных сообществ.

Мы оценивали действие ФТ на 24-часовой цикл развития изолятов *K. pneumoniae* и *E. coli* в клетках аденокарциномы простаты человека. Ранее установлено, что по своим фармакологическим свойствам ФТ имеет высокую тканевую доступность, проникает внутриклеточно и сохраняет активность в эукариотических клетках [32]. Внесение ФТ в среду культивирования достоверно снижало количество

бактерий, формирующих внутриклеточные бактериальные сообщества, что было показано при определении жизнеспособных микроорганизмов и выявлении внутриклеточных структур при микроскопировании через 24 ч контакта патогенов с клетками.

В настоящее время мы изучаем механизмы, благодаря которым ФТ подавляет внутриклеточную репликацию бактерий. С учётом того, что ФТ не оказывает прямого антибактериального действия, предполагаемый механизм заключается в блокировании тех факторов вирулентности бактерий, которые отвечают за взаимодействие с клеткой хозяина при сосуществовании и персистенции бактерий.

Возможность подавления биоплёнок ФТ была показана ранее для различных патогенов, в том числе карбапенемрезистентных возбудителей внутрибольничных инфекций. Изучение динамики формирования биоплёнок *in vitro* и влияния ФТ на этот процесс показало, что препарат блокирует биоплёнокообразование на этапе объединения микроколоний и образования многослойной структуры. Культивирование в присутствии ФТ оказывает ингибирующее действие на способность изолятов к формированию биоплёнки и, как следствие, снижение продукции экзополисахаридов [26, 27]. Полученные результаты имеют важное практическое значение, поскольку ЭПМ является ключевым фактором в устойчивости биоплёнки к антибактериальным препаратам и защите от иммунного ответа.

Заключение

В проведённых экспериментах по изучению влияния ингибитора ССТТ и жгутика — ФТ на вирулентные свойства клинических изолятов представителей трех видов уропатогенов в условиях *in vitro* было показано, что ФТ подавляет ключевые этапы установления персистенции бактерий при хронических инфекциях, такие как инвазию в эпителиальные клетки и формирование резервуаров патогенов в виде внутриклеточных бактериальных сообществ и поверхностных биоплёнок. Такие свойства ФТ, как подавление биоплёнок и ингибирование внутриклеточной репликации, являются значительным преимуществом разработанного оригинального отечественного препарата перед используемыми в настоящее время антибиотиками.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Bonkat G., Wagenlehner F., Kranz J. Keep it simple: a proposal for a new definition of uncomplicated and complicated urinary tract infections from the EAU urological infections guidelines panel. *Eur. Urol.* 2024;86(3):195–7.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2024.05.007>
2. Bell B.G., Schellevis F., Stobberingh E., et al. A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance. *BMC Infect. Dis.* 2014;14:13.
DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-13>
3. Pigrau C., Escolà-Vergé L. Recurrent urinary tract infections: from pathogenesis to prevention. *Med. Clin. (Barc.)*

- 2020;155(4):171–7.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2020.04.026>
4. WHO. Antimicrobial resistance: global report on surveillance;2014. <https://who.int/publications/i/item/9789241564748>
 5. Flores-Mireles A.L., Walker J.N., Caparon M., Hultgren S.J. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015;13(5):269–84. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro3432>
 6. Sabih A., Leslie S.W. *Complicated Urinary Tract Infections*. Treasure Island;2025.
 7. Tandogdu Z., Wagenlehner F. Global epidemiology of urinary tract infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2016;29(1):73–9. DOI: <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000228>
 8. Klein R.D., Hultgren S.J. Urinary tract infections: microbial pathogenesis, host–pathogen interactions and new treatment strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* 2020;18(4):211–26. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0324-0>
 9. Палагин И.С., Сухорукова М.В., Дехнич А.В. и др. Антибиотикорезистентность возбудителей внебольничных инфекций мочевых путей в России: результаты многоцентрового исследования «ДАРМИС-2018». *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2019;21(2):134–46. Palagin I.S., Sukhorukova M.V., Dekhnic A.V., et al. Antimicrobial resistance of pathogens causing community-acquired urinary tract infections in Russia: results of multicenter study «DARMIS-2018». *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2019;21(2):134–46. DOI: <https://doi.org/10.36488/cmhc.2019.2.134-146>
EDN: <https://elibrary.ru/vdyqtb>
 10. Mittal S., Sharma M., Chaudhary U. Biofilm and multidrug resistance in uropathogenic *Escherichia coli*. *Pathog. Glob. Health.* 2015;109(1):26–9. DOI: <https://doi.org/10.1179/2047773215Y.0000000001>
 11. Paczosa M.K., Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2016;80(3):629–61. DOI: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00078-15>
 12. Jalil M.B., Al Atbee M.Y.N. The prevalence of multiple drug resistance *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients with urinary tract infections. *J. Clin. Lab. Anal.* 2022;36(9):e24619. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcla.24619>
 13. Ashurst J.V., Dawson A. *Klebsiella Pneumonia*. Treasure Island;2023.
 14. Clegg S., Murphy C.N. Epidemiology and virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiol. Spectr.* 2016;4(1). DOI: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.UTI-0005-2012>
 15. Filev R., Lyubomirova M., Bogov B., et al. Urinary tract infections caused by *Klebsiella pneumoniae* and prolonged treatment with trimethoprim/sulfamethoxazole. *Microorganisms*. 2025;13(2):422. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms13020422>
 16. Andersen T.E., Khandige S., Madelung M., et al. *Escherichia coli* uropathogenesis *in vitro*: invasion, cellular escape, and secondary infection analyzed in a human bladder cell infection model. *Infect. Immun.* 2012;80(5):1858–67. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.06075-11>
 17. Anderson G.G., Palermo J.J., Schilling J.D., et al. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science*. 2003;301(5629):105–7. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1084550>
 18. Spaulding C.N., Hultgren S.J. Adhesive pili in UTI pathogenesis and drug development. *Pathogens*. 2016;5(1):30. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens5010030>
 19. Oh W.S., Hur J.A., Kim E.S., et al. Factors associated with specific uropathogens in catheter-associated urinary tract infection: developing a clinical prediction model. *J. Int. Med. Res.* 2014;42(6):1335–47. DOI: <https://doi.org/10.1177/0300060514543035>
 20. Jiménez-Alcaide E., Medina-Polo J., García-González L., et al. Healthcare-associated urinary tract infections in patients with a urinary catheter: Risk factors, microbiological characteristics and patterns of antibiotic resistance. *Arch. Esp. Urol.* 2015;68(6):541–50. (in Spanish)
 21. Akkerman A.E., Kuyvenhoven M.M., Verheij T.J.M., van Dijk L. Antibiotics in Dutch general practice: nationwide electronic GP database and national reimbursement rates. *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.* 2008;17(4):378–83. DOI: <https://doi.org/10.1002/pds.1501>
 22. Maharjan G., Khadka P., Siddhi S.G., et al. Catheter-associated urinary tract infection and obstinate biofilm producers. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 2018;2018:7624857. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/7624857>
 23. Specian A.F.L., Serpeloni J.M., Tuttis K. LDH, proliferation curves and cell cycle analysis are the most suitable assays to identify and characterize new phytotherapeutic compounds. *Cytotechnology*. 2016;68(6):2729–44. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10616-016-9998-6>
 24. O'Toole G., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 2000;54:49–79. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49>
 25. Zigangirova N.A., Nesterenko L.N., Sheremet A.B., et al. Fluorothiazinone, a small-molecular inhibitor of T3SS, suppresses salmonella oral infection in mice. *J. Antibiot.* 2021;74(4):244–54. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41429-020-00396-w>
 26. Koroleva E.A., Soloveva A.V., Morgunova E.Y., et al. Fluorothiazinone inhibits the virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* involved in the development of urinary tract infection. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2023;76(5):279–90. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41429-023-00602-5>
 27. Bondareva N.E., Soloveva A.V., Sheremet A.B., et al. Preventative treatment with Fluorothiazinone suppressed *Acinetobacter baumannii*-associated septicemia in mice. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2022;75(3):155–63. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41429-022-00504-y>
 28. Savitskii M.V., Moskaleva N.E., Brito A., et al. Pharmacokinetics, tissue distribution, bioavailability and excretion of the anti-virulence drug Fluorothiazinone in rats and rabbits. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2024;77(6):382–8. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41429-024-00719-1>
 29. Белобородов В.Б., Зигангирова Н.А., Лубенец Н.Л. и др. Влияние цефепима/фтортиазинона в сравнении с цефепимом/плацебо на клиническое излечение и микробиологическую эрадикацию у пациентов с осложнёнными инфекциями мочевыводящих путей: проспективное рандомизированное клиническое исследование. *Антибиотики и Химиотерапия*. 2024;(9-10):31–9. Beloborodov V.B., Zigangirova N.A., Lubenec N.L., et al. The effect of cefepime/fluorothiazinone compared with cefepime/placebo on clinical cure and microbiological eradication in patients with complicated urinary tract infections: a prospective randomized clinical trial. *Antibiotics and Chemotherapy*. 2024;(9-10):31–9. DOI: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-9-10-31-39>
EDN: <https://elibrary.ru/AAHDQM>
 30. Cano V., Moranta D., Llobet-Brossa E., et al. *Klebsiella pneumoniae* triggers a cytotoxic effect on airway epithelial cells. *BMC Microbiol.* 2009;9:156. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-156>
 31. Parazzini F., Ricci E., Fedele F., et al. Systematic review of the effect of D-mannose with or without other drugs in the treatment of symptoms of urinary tract infections/cystitis (review). *Biomed. Rep.* 2022;17(2):69. DOI: <https://doi.org/10.3892/br.2022.1552>
 32. Zigangirova N.A., Lubenec N.L., Beloborodov V.B., et al. A new «non-traditional» antibacterial drug fluorothiazinone – clinical research in patients with complicated urinary tract infections. *Antibiotics (Basel)*. 2024;13(6):476. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics13060476>

Информация об авторах

Капотина Лидия Николаевна — канд. техн. наук, с. н. с. лаб. хламидиозов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, lidiya.kapotina57@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0159-5053>

Моргунова Елена Юрьевна — н. с. лаб. хламидиозов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, lena.morgunova.1968@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3142-0983>

Нелюбина Станислава Андреевна — м. н. с. лаб. хламидиозов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, 19ctasy94@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5157-1415>

Федина Елена Дмитриевна — канд. мед. наук, с. н. с. лаб. хламидиозов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, e.fedina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7205-4310>

Королёва Екатерина Андреевна — канд. биол. наук, с. н. с. лаб. хламидиозов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, korolevakate@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9702-2940>

Бондарева Наталья Евгеньевна — канд. мед. наук, с. н. с. лаб. хламидиозов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, natalia.d@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5244-2965>

Перепанова Тамара Сергеевна — д-р мед. наук, профессор, рук. группы инфекционно-воспалительных заболеваний и клинической фармакологии НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина — филиала НМИЦ радиологии, Москва, Россия, perepanova2003@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2877-0029>

Зигангирова Наиля Ахатовна — д-р биол. наук, профессор, член-корр. РАН, зав. отделом медицинской микробиологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, zigangirova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3188-1608>

Участие авторов: Капотина Л.Н. — анализ цитотоксичности, оценка плавательной подвижности, биоплёнкообразование, обработка результатов, написание текста; Моргунова Е.Ю. — изучение инвазии и внутриклеточного развития патогенов, обработка результатов; Нелюбина С.А. — культивирование изолятов, обработка результатов, редактирование статьи; Федина Е.Д., Королёва Е.А., Бондарева Н.Е. Перепанова Т.С. — редактирование статьи; Зигангирова Н.А. — концепция и дизайн исследования, написание текста. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 05.08.2025;
принята к публикации 14.10.2025;
опубликована 31.10.2025

Information about the authors

Lydiya N. Kapotina — Cand. Sci. (Technics), senior researcher, Chlamydia department, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, lidiya.kapotina57@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0159-5053>

Elena Yu. Morgunova — researcher, Chlamydia department, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, lena.morgunova.1968@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3142-0983>

Stanislava A. Nelyubina — junior researcher, Chlamydia department, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, 19ctasy94@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5157-1415>

Elena D. Fedina — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Chlamydia department, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, e.fedina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7205-4310>

Ekaterina A. Koroleva — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Chlamydia department, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, korolevakate@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9702-2940>

Nataliya E. Bondareva — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Chlamydia department, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, natalia.d@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5244-2965>

Tamara S. Perepanova — Dr. Sci. (Med.), Professor, Head, Infectious and inflammatory diseases and clinical pharmacology group, N. Lopatkin Scientific Research Institute of Urology and Interventional Radiology — Branch of the National Medical Research Radiological Center, Moscow, Russia, perepanova2003@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2877-0029>

Naylia A. Zigangirova — Dr. Sci. (Biol.), Professor, RAS Corresponding member, Head, Department of medical microbiology, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, zigangirova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3188-1608>

Author contribution: Kapotina L.N. — cytotoxicity analysis, assessment of swimming motility, biofilm formation, processing of results, text writing; Morgunova E.Yu. — study of invasion and intracellular development of pathogens, processing of results; Nelyubina S.A. — cultivation of isolates, processing of results, editing of the article; Fedina E.D., Koroleva E.A., Bondareva N.I., Perepanova T.S. — editing the article; Zigangirova N.A. — concept and design of the study, text writing. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 05.08.2025;
accepted for publication 14.10.2025;
published 31.10.2025

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-678>



Характеристика молекулярно-генетических свойств эпидемических штаммов *Klebsiella pneumoniae* и *Staphylococcus aureus* — возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, циркулирующих на территории Нижегородской области

Соловьева И.В.¹, Точилина А.Г.^{1✉}, Белова И.В.¹, Зайцева Н.Н.¹, Кучеренко Н.С.², Садыкова Н.А.², Молодцова С.Б.¹, Кропотов В.С.¹

¹Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;

²Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Нижегородской области, Нижний Новгород, Россия

Аннотация

Введение. Молекулярно-эпидемиологический мониторинг направлен на получение актуальной информации о генетических вариантах возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), циркулирующих в регионе. В настоящее время особое внимание уделяется слежению за представителями группы ESKAPE, т. к. они являются частой причиной ИСМП, осложняют течение основного заболевания и становятся всё более серьёзной угрозой здоровью и жизни пациентов, поскольку обладают комплексом генов патогенности и разнообразными механизмами антибиотикорезистентности.

Цель работы — анализ результатов полногеномного секвенирования эпидемических штаммов возбудителей ИСМП — *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* и *Staphylococcus aureus*, циркулирующих на территории Нижегородской области.

Материалы и методы. Использованы классические бактериологические методы, MALDI TOF масс-спектрометрия, полногеномное секвенирование, биоинформатические методы.

Результаты. Углублённый анализ показал циркуляцию в отделении новорождённых популяции классических штаммов *K. pneumoniae* сиквенс-типа (ST) 3-K-типа (K) 3, содержащих ряд генов патогенности и бета-лактамазу *bla*_{SHV-1}. В многопрофильном стационаре обнаружена циркуляция популяции штаммов конвергентного патотипа *K. pneumoniae* ST395-K39, а также выявлены штаммы конвергентного патотипа *K. pneumoniae* ST395-K2, K47 и штаммы классического патотипа *K. pneumoniae* ST5209-K35, ST441-K62, ST147-K64, содержащие в геноме спектр генов патогенности и бета-лактамаз, в том числе Нью-Дели металло-бета-лактамазу *bla*_{NDM-1}. Штаммы *S. aureus*, связанные с катетер-ассоциированными инфекциями кровотока, обладают выраженным патогенным потенциалом, относятся к 13 различным ST и 19 spa-типам (t). В гемодиализных центрах и отделениях гемодиализа выявлена циркуляция штаммов метициллин-резистентных (SCCmec IV, ST8, t008) и метициллин-чувствительных (ST1, t127) стафилококков.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о циркуляции в лечебно-профилактических медицинских организациях конвергентных и классических штаммов *K. pneumoniae* и вирулентных штаммов *S. aureus*, что обосновывает необходимость молекулярно-эпидемиологического мониторинга.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи, полногеномное секвенирование, микробиологический мониторинг

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов или их законных представителей. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом № 1 по проведению научных исследований с участием человека в качестве объекта исследования Приволжского исследовательского медицинского университета (протокол № 7 от 05.07.2018).

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: Соловьева И.В., Точилина А.Г., Белова И.В., Зайцева Н.Н., Кучеренко Н.С., Садыкова Н.А., Молодцова С.Б., Кропотов В.С. Характеристика молекулярно-генетических свойств эпидемических штаммов *Klebsiella pneumoniae* и *Staphylococcus aureus* — возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, циркулирующих на территории Нижегородской области. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2025;102(5):560–570.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-678>

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

Original Study Article
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-678>

Characterization of the molecular genetic properties of epidemic strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*, the pathogens of healthcare-associated infections circulating in the Nizhny Novgorod region

Irina V. Solovyeva¹, Anna G. Tochilina^{1✉}, Irina V. Belova¹, Natalya N. Zaitseva¹,
Natalia S. Kucherenko², Natalia A. Sadykova², Svetlana B. Molodtsova¹, Vasiliy S. Kropotov¹

¹Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia;

²Department of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Welfare in the Nizhny Novgorod region, Nizhny Novgorod, Russia

Abstract

Introduction. Molecular epidemiological monitoring is aimed at obtaining up-to-date information on the genetic variants of healthcare-associated infections (HAIs) circulating in the region. Currently, special attention is being paid to monitoring representatives of the ESKAPE group, as they are a frequent cause of HAIs, complicate the course of the underlying disease, and are becoming an increasingly serious threat to the health and lives of patients due to their complex pathogenicity genes and diverse antibiotic resistance mechanisms.

The aim of the study is to analyze the results of whole-genome sequencing of epidemic strains of pathogens of HAIs — *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* — circulating in the Nizhny Novgorod region.

Materials and methods. Classical bacteriological methods, MALDI-TOF mass spectrometry, whole-genome sequencing, and bioinformatics methods were used.

Results. In-depth analysis revealed the circulation of a population of classical *K. pneumoniae* strains of sequence type (ST) 3-K type (K) 3 in the neonatal intensive care unit, containing a number of virulence genes and the *bla*_{SHV-1} beta-lactamase. Circulation of a population of *K. pneumoniae* strains of the convergent pathotype ST395 and K39 was detected in a multidisciplinary hospital, and strains of the convergent pathotype *K. pneumoniae* ST395-K2, K47, as well as strains of the classical pathotype *K. pneumoniae* ST5209-K35, ST441-K62, ST147-K64, containing a spectrum of pathogenicity genes and beta-lactamases in their genome, including New Delhi metallo-beta-lactamase *bla*_{NDM-1}, were identified. *S. aureus* strains associated with catheter-associated bloodstream infections have significant pathogenic potential, belonging to 13 different STs and 19 spa types (t). Circulation of methicillin-resistant (SCCmec IV, ST8, t008) and methicillin-susceptible (ST1, t127) staphylococcal strains has been detected in hemodialysis centers and departments.

Conclusion. The data obtained indicate the circulation of convergent and classical strains of *K. pneumoniae* and virulent strains of *S. aureus* in medical and preventive organizations, which justifies the need for molecular epidemiological monitoring.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, healthcare-associated infections, whole-genome sequencing, microbiological monitoring

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients or their legal representatives. The research protocol was approved by the Ethical Committee No. 1 on conducting scientific research with human subjects as a research object of Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod (protocol No. 7, May 7, 2018).

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: Solovyeva I.V., Tochilina A.G., Belova I.V., Zaitseva N.N., Kucherenko N.S., Sadykova N.A., Molodtsova S.B., Kropotov V.S. Characterization of the molecular genetic properties of epidemic strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*, the pathogens of healthcare-associated infections circulating in the Nizhny Novgorod region. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(5):560–570.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-678>

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

Введение

Молекулярно-эпидемиологический мониторинг становится одной из неотъемлемых задач ор-

ганизации системы эпидемиологического надзора за инфекционными заболеваниями, т. к. позволяет отслеживать циркуляцию условно-патогенных ми-

кроорганизмов и своевременно выявлять признаки возможных массовых случаев инфекций, к которым относятся: выделение однородного спектра микроорганизмов у обследуемых лиц; увеличение частоты возникновения случаев инфекционных заболеваний, обусловленных одним видом или группой видов возбудителей, увеличение частоты обнаружения госпитальных штаммов. Его задачами является слежение за популяционной структурой возбудителей инфекций, в том числе инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), MLST-типирование штаммов, анализ генов патогенности, детерминант антибиотикорезистентности, обнаружение новых вариантов госпитальных штаммов, наблюдение за их изменчивостью с целью оценки прогнозирования эпидемиологической ситуации и обоснования своевременного вмешательства в ход эпидемического процесса [1].

ESKAPE-патогены являются частой причиной ИСМП, осложняют течение основного заболевания и представляют собой серьёзную угрозу здоровью и жизни пациентов, т. к. способны быстро адаптироваться и находить новые способы сопротивления действию лекарственных средств, дезинфицирующих средств и антисептиков, а также на генетическом уровне передавать эту способность другим патогенам [2, 3].

Среди бактерий, ставших причиной госпитальных инфекций, *Klebsiella pneumoniae* и *Staphylococcus aureus* занимают лидирующее положение, причём наблюдается рост доли устойчивых к карбапенемам *K. pneumoniae* и широкое распространение *S. aureus*, принадлежащих к группе метициллин-резистентных стафилококков (MRSA), способных вызывать вспышечную заболеваемость и обуславливать катетер-ассоциированные инфекции кровотока (КАИК) [4, 5].

Цель исследования — анализ результатов полногеномного секвенирования эпидемических штаммов возбудителей ИСМП — *K. pneumoniae* ssp. *pneumoniae* и *S. aureus*, циркулирующих на территории Нижегородской области.

Материалы и методы

Исследуемые штаммы

Изучены 55 эпидемических штаммов возбудителей: 17 штаммов *K. pneumoniae* ssp. *pneumoniae* и 38 штаммов *S. aureus*. По месту выделения штаммы были разделены на три группы:

- 1-ю группу образовали 7 штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в отделении новорождённых педиатрического стационара от больных детей (желудочное содержимое) ($n = 4$), с оборудования и предметов ухода (смыывы со шланга для отсоса, шприца для кормления) ($n = 3$);

- 2-ю группу — 10 штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в отделениях многопрофильного стационара от больных (отделяемое ран) ($n = 9$) и из внешней среды отделения (смыыв с крана раковины отделения реанимации) ($n = 1$);
- 3-ю группу — 38 штаммов *S. aureus*, из них 31 штамм — от пациентов с КАИК, получавших амбулаторное лечение в гемодиализных центрах города и области и проходивших стационарное лечение в лечебно-профилактических медицинских организациях (МО) города (кровь, рана в области катетера, перитонеальная жидкость, назальный мазок); 3 штамма, выделенные от медперсонала (назальный мазок), и 4 — из внешней среды МО (смыывы с оборудования).

Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов или их законных представителей. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом № 1 по проведению научных исследований с участием человека в качестве объекта исследования Приволжского исследовательского медицинского университета (протокол № 7 от 05.07.2018).

Культивирование и идентификация бактерий

Выделение штаммов условно-патогенных микроорганизмов осуществляли с использованием классического бактериологического метода, идентификацию проводили методом MALDI TOF масс-спектрометрии с использованием масс-спектрометра «Autoflex» («Bruker Daltonics»). Чувствительность бактерий к антибиотикам изучали диско-диффузионным методом на «Питательной среде для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам — агаре Мюллер–Хинтон II» (ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора) с использованием расширенных наборов дисков для энтеробактерий (набор № 7) и стафилококков (набор № 14) (НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера). Чувствительность штаммов к цефтазидиму-авибактаму изучали с использованием дисков цефтазидим + авибактам 10/4 мкг («Mast Group»), к тигециклину — дисков с тигециклином 15 мкг («Mast Group»). Оценку проводили в соответствии с клиническими рекомендациями «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам»¹.

Полногеномное секвенирование

Подготовку библиотек осуществляли с помощью набора «TrueSeq» («Illumina Inc.»), секвенирование выполняли на платформе «MiSeq» («Illumina

¹ Рекомендации МАКМАХ версия 2024. URL: <https://www.antibiotic.ru/minzdrav/category/clinical-recommendations>

Inc.)). Исходные риды обрабатывали утилитой Trimmomatic, для сборки ридов *de novo* использовали программы SPAdes v. 3.11.1 и Prokka v. 1.12 [6, 7]. Все нуклеотидные последовательности были задепонированы в международной базе GenBank.

Анализ полногеномных последовательностей проводили с использованием программ VFDB² [8], ResFinder³ [9], веб-платформы BIGSdb-Pasteur⁴ [10], ресурса PubMLST⁵ [11], программ Spa-typer и SCCmecFinder [12, 13]. Дендрограммы строили методом максимального правдоподобия с определением генетической дистанции между штаммами микроорганизмов с помощью программы parsnp v. 1.7.4, для оценки первичной топологии древа использовали алгоритм FastTree 2.1.1 и тест Shimodaira–Hasegawa [14]. В качестве референсных использовали последовательности из базы данных GenBank: GCF_000240185.1, GCA_000013425.1, затем ветку референсного генома удаляли. Визуализацию филогенетических деревьев проводили с помощью сервиса iTol [15].

Результаты

В результате изучения молекулярно-генетических свойств штаммов *K. pneumoniae* 1-й группы установлено, что у всех штаммов присутствуют кластеры генов колибактина, иерсиниобаكتина и гены, ответственные за образование фимбрий 3-го типа, у 3 штаммов был обнаружен ген — регулятор гипермукоидного фенотипа *rmpA* (таблица). В геномах всех штаммов была выявлена детерминанта антибиотикорезистентности (АБР), характерная для данного вида, — бета-лактамаза *bla*_{SHV-1}, которая обуславливает природную резистентность микроорганизмов к аминопенициллинам — ампициллину и амоксициллину. Фенотипически штаммы были чувствительны ко всем антибиотикам других групп: цефалоспорином III–V поколений (цефазолин, цефотаксим, цефтриаксон, цефтазидим, цефтазидим/авибактам, цефепим, цефтаролин), аминогликозидам (гентамицин), фторхинолонам (ципрофлоксацин), карбапенемам (эртапенем, имипенем, меропенем), монобактамам (азтреонам), полимиксинам (колистин), тетрациклинам (тигеклин), триметоприм/сульфаметоксазолу. В результате анализа конституционных генов (генов домашнего хозяйства) и аллелей гена *wzi* была установлена принадлежность штаммов к серотипу (ST) 3 и капсульному типу (K) 3 (таблица).

Штаммы *K. pneumoniae* 2-й группы различались по молекулярно-генетическим свойствам.

В геномах штаммов *K. pneumoniae* 3254, 3260 и 3263 были обнаружены полные кластеры генов сидерофора аэробактина (*iucABCD* и *iutA*), штамм *K. pneumoniae* 3263 отличался наличием кластера генов иерсиниобаكتина (*fyuA*, *irp1,2*, *ybtAEPQSTUX*) (рис. 1). У всех штаммов был выявлен спектр генов АБР — бета-лактамаз и карбапенемаз *bla*_{TEM-1}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{SHV-1}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{OXA-48} и детерминанта устойчивости к фосфомицину — *fosA*. Это объясняет тот факт, что все 3 штамма имели фенотип MDR и были устойчивы к пенициллинам, цефалоспорином, аминогликозидам, фторхинолонам, монобактамам и карбапенемам (эртапенему). По анализу конституционных генов и аллелей гена *wzi* была установлена принадлежность штаммов к ST395 и K39.

Спектр генов патогенности штаммов *K. pneumoniae* 3245 и 3251, как и у штаммов *K. pneumoniae* 3254 и 3260, был представлен кластером генов аэробактина (*iucABCD* и *iutA*) (рис. 1). У *K. pneumoniae* 3245 в геноме выявлен идентичный указанным выше штаммам спектр генов АБР (*bla*_{TEM-1}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{SHV-1}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{OXA-48}), за исключением *fosA*. Этот штамм имел такие же фенотипы чувствительности и резистентности к антимикробным препаратам, как у штаммов, описанных выше. *K. pneumoniae* 3251 отличался наличием детерминанты *bla*_{CTX-M-3}, отсутствием генов *bla*_{OXA-48} и *bla*_{CTX-M-15} и был чувствителен к карбапенемам. *K. pneumoniae* 3245 и 3251 также принадлежали к ST395, но отличались от штаммов *K. pneumoniae* 3254, 3260, 3263 по аллелям гена *wzi* и принадлежали к K47.

Штаммы *K. pneumoniae* 3255 и 3259 характеризовались наличием полных кластеров генов аэробактина (*iucABCD* и *iutA*) и иерсиниобаكتина (*fyuA*, *irp1,2*, *ybtAEPQSTUX*), причем у *K. pneumoniae* 3259 был выявлен ген сальмохелина (*iro*). Спектр их генов АБР был идентичен спектру детерминант *K. pneumoniae* 3254, 3260, 3263, 3245 (*bla*_{TEM-1}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{SHV-1}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{OXA-48}, *fosA*). *K. pneumoniae* 3255 и 3259 также имели фенотип MDR и были устойчивы к пенициллинам, цефалоспорином, аминогликозидам, фторхинолонам, карбапенемам (эртапенему) и тигеклину. Эти штаммы тоже принадлежали к ST395, но к K2.

У штаммов *K. pneumoniae* 3247, 3253 и 3256 была обнаружена лишь 1 детерминанта кластера аэробактина *iutA* (рис. 1). Изолят *K. pneumoniae* 3256 содержал в геноме бета-лактамазы *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{OXA-244} и *bla*_{SHV-1}, показал фенотипическую резистентность к цефалоспорином, аминогликозидам и чувствительность к карбапенемам. Была установлена его принадлежность к ST5209 и K35. У *K. pneumoniae* 3253 выявлены 2 детерминанты АБР: *bla*_{SHV-168} и *fosA*, штамм был чувствителен к антибактериальным препаратам всех групп, за исключением аминопенициллинов, и отнесен к ST441 и K62.

² Virulence factor database. URL: <http://www.mgc.ac.cn/VFs>

³ ResFinder. URL: <http://genepi.food.dtu.dk/resfinder>

⁴ Institut Pasteur *Klebsiella pneumoniae* species complex. URL: <https://bigsdb.pasteur.fr/klebsiella>

⁵ PubMLST. MLST Database. *Staphylococcus aureus*. URL: <https://pubmlst.org/organisms/staphylococcus-aureus>

Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в отделении новорождённых

Штамм	Сиквенс-тип (ST)	Капсульный тип (K)	Гены патогенности				Гены АБР
			ген регулятора гипермукоидного фенотипа	гены синтеза колибактина	гены синтеза иерсиниобактина	гены фимбрий 3-го типа	
<i>n</i> = 3	3	3	<i>rmpA</i>	<i>clbABCDEFGHILMNOPQ</i>	<i>fyuA</i> , <i>irp1,2</i> , <i>ybtAEQPSTUX</i>	<i>mrkABCFHIJ</i>	<i>bla_{SHV-1}</i>
<i>K. pn</i> 849 JAVGJO000000000							
<i>K. pn</i> 852 JAVHUD000000000							
<i>K. pn</i> 862 JAVBWS000000000							
<i>n</i> = 4	3	3	—	<i>clbABCDEFGHILMNOPQ</i>	<i>fyuA</i> , <i>irp1,2</i> , <i>ybtAEQPSTUX</i>	<i>mrkABCFHIJ</i>	<i>bla_{SHV-1}</i>
<i>K. pn</i> 850 JAVCZJ000000000							
<i>K. pn</i> 854 JAVGJN000000000							
<i>K. pn</i> 863 JAVBWT000000000							
<i>K. pn</i> 893 JAVHUE000000000							

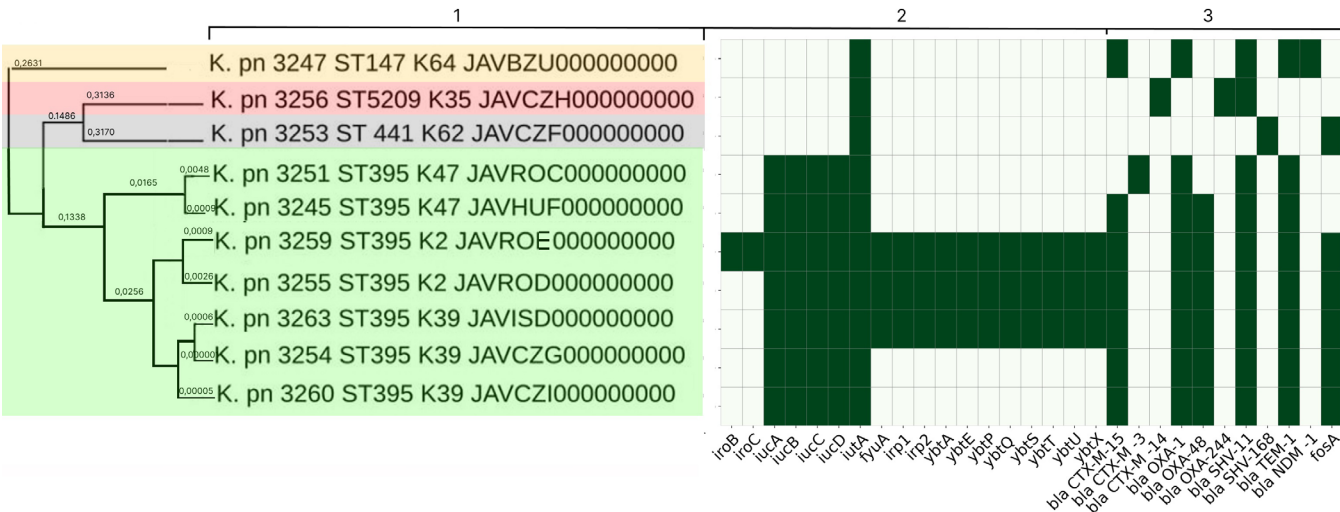


Рис. 1. Филогенетическая реконструкция геномов штаммов *K. pneumoniae* 2-й группы.

1 — вид микроорганизма, номер штамма, ST, K-тип, номер в базе данных GenBank; 2 — детерминанты генов патогенности (зелёный — наличие признака, белый — отсутствие); 3 — детерминанты АБР (зелёный — наличие признака, белый — отсутствие).

В геноме *K. pneumoniae* 3247 обнаружены гены *bla_{NDM-1}*, *bla_{TEM-1}*, *bla_{CTX-M-15}*, *bla_{SHV-11}*, *bla_{OXA-1}*, штамм был фенотипически устойчив к пенициллинам, цефалоспорином, аминогликозидам, фторхинолонам, всем препаратам из группы карбапенемов (эртапенем, имипенем, меропенем) и чувствителен к колистину, тигециклину и цефтазидим-авибактаму и отнесен к ST147 и K64.

В геномах всех штаммов *S. aureus* 3-й группы выявлены гены адгезинов, системы секреции VII типа и гамма-гемолизина.

Штаммы *S. aureus* 2226, 3092, 3110, 2211, 3196, 3197 и 3198 характеризовались идентичным спектром генов патогенности, который включал, кроме вышеперечисленных, гены сериновых протеаз *splABCDE*, иммунного уклонения *sak*, *scn*, энтеро-

токсина *A sea*, эксфолиативного токсина *eta* и лейкотоксинов *lukDE*. У них были обнаружены *SCCmec* кассеты IV типа, у штаммов 3196, 3197, 3110, 3092 выявлен ген бета-лактамазы *blaZ*, у *S. aureus* 3198, 2211 и 2226 — гены резистентности к эритромицину и хлорамфениколу *ermC* и *cat* (рис. 2). Штаммы показали фенотипическую резистентность к оксациллину и цефокситину, что может указывать на их принадлежность к группе MRSA. В результате MLST-типирования и анализа последовательности повторов гена белка A была установлена их принадлежность к ST8 и spa-типу (t) t008. Также к ST8, но к t024 принадлежал штамм *S. aureus* 3107, отличающийся отсутствием *SCCmec* кассеты.

В геномах штаммов *S. aureus* 3086, 3087, 3088 выявлены гены патогенности *splABCDE*, *eta*, *lukDE*,

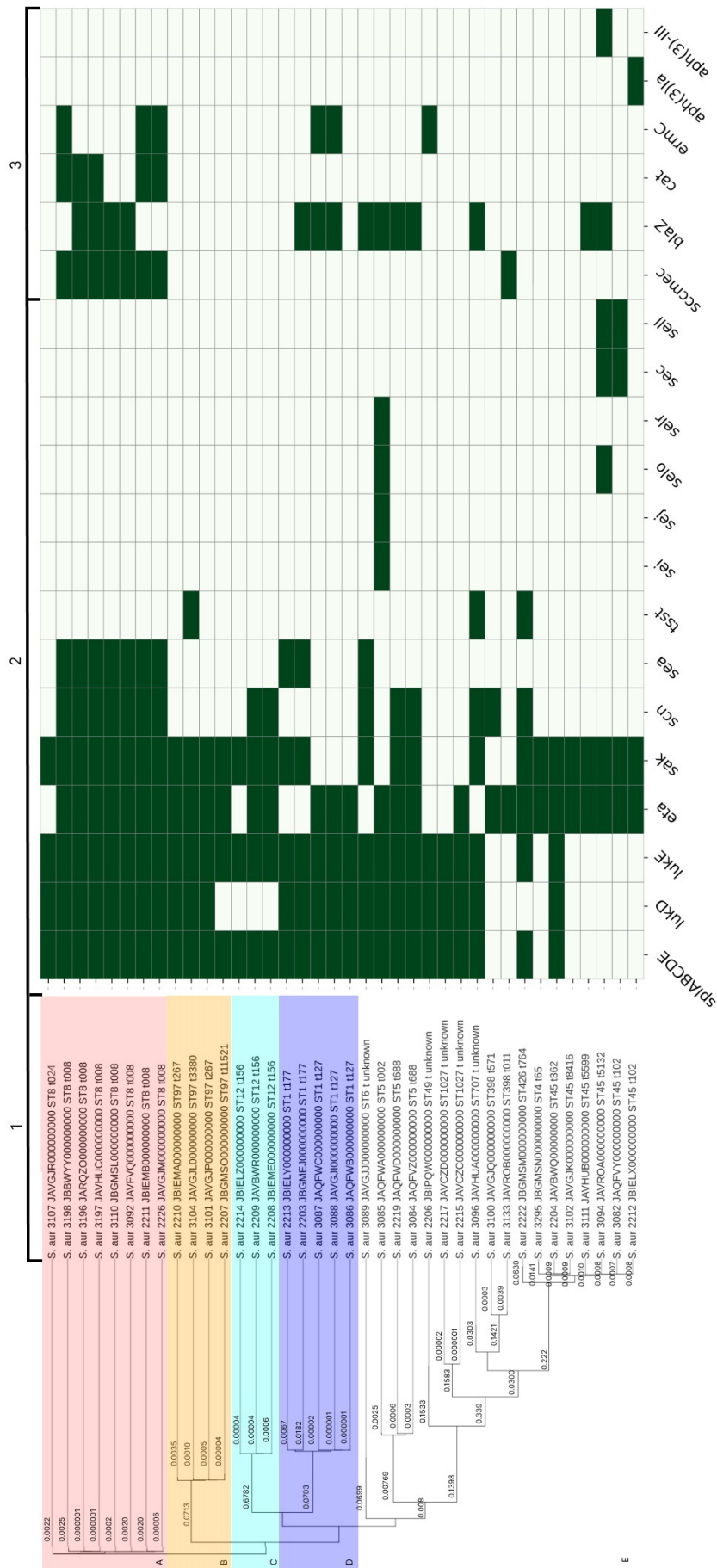


Рис. 2. Филогенетическая реконструкция геномов штаммов *S. aureus* 3-й группы.
1 — вид микроорганизма, номер штамма, номер в базе данных GenBank, ST, сра-тип; 2 — детерминанты генов патогенности (зелёный — наличие признака, белый — отсутствие);
3 — детерминанты АБР (зелёный — наличие признака, белый — отсутствие).

а *S. aureus* 2203 и 2213 характеризовались наличием генов *sak* и *scn* (рис. 2). У *S. aureus* 3086, 3087, 3088 обнаружены гены АБР *blaZ* и *ermC*, у *S. aureus* 2213 — только *blaZ*. Все 5 изолятов были устойчивы к амоксициллину, тетрациклину и линкозамидам. Установлено, что штаммы 3086, 3087, 3088 принадлежали к ST1 t127, а *S. aureus* 2203 и 2213 — к ST1 t177.

В результате анализа молекулярно-генетических свойств штаммов *S. aureus* 3082, 3094, 3111, 3102, 2212, 2204 были выявлены гены эксфолиативного токсина *eta* и стафилокиназы *sak*, а также установлено отсутствие детерминант сериновых протеаз (*spl*) и лейкотоксинов D и E (*lukDE*). У *S. aureus* 3082 были обнаружены гены энтеротоксинов *sec*, *sell*; у 3094 — *sec*, *sell*, *selo*. У *S. aureus* 3082, 3111, 3094, 3082 присутствовал ген *blaZ*; у штамма 3094 — ген *blaZ* и детерминанта устойчивости к аминогликозидам *aph(3')-III*; у *S. aureus* 2212 — *aph(3')-Ia*. Все 5 изолятов были фенотипически резистентны к амоксициллину и амикацину. Установлена принадлежность штаммов к ST45, но разным спра-типам: t102, t362, t8416, t5599, t5132 (рис. 2).

Штаммы *S. aureus* 3084, 3085, 2219 характеризовались наличием генов патогенности *splABCDE*, *eta*, *lukDE* и *blaZ*. У 3085 штаммов выявлены гены энтеротоксинов *sei*, *sej*, *selo*, *selr*. Все штаммы были фенотипически резистентны к амоксициллину, установлена их принадлежность к ST5, t002 и t688 (рис. 2). *S. aureus* 3096 и 3089 характеризовались наличием генов *splABCDE*, *lukDE*, *sak*, *scn*, *blaZ*, у 3096 присутствовал ген *tsst*, у 3089 — *sea*. Они также резистентны к амоксициллину и были отнесены к ST707 и ST6, причём используемая в исследовании программа не позволила определить их спра-тип. *S. aureus* 3100 и 3133 характеризовались отсутствием генов сериновых протеаз (*spl*), лейкотоксинов D и E (*lukDE*), штамм 3133 был устойчив к оксациллину и цефокситину, в его геноме обнаружена SCCmec кассета IV типа. Оба штамма принадлежали к ST398, t571 и t011 (рис. 2).

Остальные 12 штаммов относились к разным ST и спра-типам. У штаммов *S. aureus* 2210, 3104, 3102, 2207 выявлены гены *splABCDE*, *eta*, *lukDE*, *sak*, у *S. aureus* 3104 — ген синдрома токсического шока *tsst*. Штаммы принадлежали к ST97 и разным спра-типам: t267, t3380, t11521 (рис. 2). Штаммы *S. aureus* 2208, 2209 и 2214 характеризовались наличием генов *splABCDE*, *lukDE*, *sak* и *scn* и были отнесены к ST12 и t156. У *S. aureus* 2206, 2217 и 2215 выявлены гены *splABCDE* и *lukDE*, установлена их принадлежность к ST49 и ST1027, но используемая в исследовании программа не позволила определить их спра-типы. У штамма *S. aureus* 2222 выявлены гены *splABCDE*, *lukE*, *sak*, *scn*, *eta*, *tsst*, он был отнесён к ST426 и t764. *S. aureus* 3295 характеризовался наличием детерминант *sak* и *eta* и был

отнесён к ST 4. У всех 12 штаммов отсутствовали детерминанты АБР, они проявили фенотипическую чувствительность к антибактериальным препаратам всех групп.

Всего в ходе работы от пациентов с КАИК, медицинского персонала и внешней среды МО города и области были выделены штаммы *S. aureus*, принадлежащие к 13 различным ST и 19 спра-типам.

Обсуждение

Под циркуляцией возбудителя понимают его постоянную и последовательную передачу от одного восприимчивого организма к другому, обеспечивающую его существование как биологического вида, а также распространение возбудителя ИСМП в пределах МО, характеризующееся колонизацией объектов внешней среды, вовлечением пациентов и персонала.

Одним из важнейших критериев госпитального штамма является его принадлежность к однородной (гомогенной) по составу популяции циркулирующих микроорганизмов [16]. Однородность популяции наиболее достоверно можно оценить с помощью изучения генетических особенностей штаммов, которые подразумевают выявление и анализ генов патогенности, АБР, определение ST путём анализа аллелей конституционных генов. Для генетического типирования *K. pneumoniae* важное значение имеет определение их К-типа, зависящего от последовательности гена *wzi*, кодирующего поверхностный белок, участвующий в сборке капсулы на наружной мембране клетки. Также имеет значение установление принадлежности штаммов к одному из известных патотипов [17].

В последние годы признано существование трех патотипов *K. pneumoniae*: гипервирулентного (hvKp), классического (сKp) и конвергентного (hv-MDRKp). Гипервирулентный патотип связан с развитием серьёзных инвазивных инфекций у здоровых иммунокомпетентных лиц. На данный момент основным признаком, коррелирующим с гипервирулентностью, является секреция сидерофоров аэробактина, сальмохелина, иерсиниобактина и экзотоксина колибактина [18]. Классический патотип глобально распространён, именно эти клебсиеллы являются представителями микробиома человека, вызывают заболевания у ослабленных больных и принадлежат к ведущим возбудителям нозокомиальных инфекций. В их геноме обязательно присутствует комплекс бета-лактамаз и карбапенемаз, а также могут выявляться отдельные гены патогенности (кроме аэробактина и сальмохелина), *K. pneumoniae* конвергентного патотипа совмещают свойства гипервирулентных и классических клебсиелл, т. е. обладают высоким патогенным потенциалом и множественной АБР, способны вызывать заболевания как у здоровых

иммунокомпетентных лиц, так и у больных людей с иммунодефицитами [17, 18].

Штаммы *K. pneumoniae* 1-й группы, выделенные в отделении новорождённых от больных детей, с оборудования и предметов ухода, были схожи по детерминантам патогенности и не содержали генов аэробактина и сальмохелина. Однако у 3 штаммов выявлен ген *rpmA* (гипермукоидный фенотип), который ранее ассоциировали с гипервирулентностью. На сегодняшний день признано, что целесообразно оценивать весь комплекс генов патогенности и наличие этой детерминанты не является значимым признаком [5, 18]. Присутствие гена только у 3 штаммов из 7 изученных (таблица) можно объяснить его плазмидным происхождением и высокой мобильностью в популяции микроорганизмов [19]. В геномах всех штаммов была выявлена одна бета-лактамаза — *bla_{SHV-1}*, при молекулярном типировании установлена принадлежность популяции штаммов к редкому сиквенс-типу — ST3 и капсульному типу K3, ранее не выделявшемуся в России (в базе данных BIGSdb-Pasteur зарегистрировано всего 16 изолятов данного ST).

Однородность молекулярно-генетических и фенотипических свойств штаммов, выделенных от больных и из внешней среды, указывает на циркуляцию в стационаре популяции классических штаммов *K. pneumoniae*. Выявление данной популяции является неблагоприятным с эпидемиологической точки зрения и подтверждает тот факт, что случаи ИСМП в отделении новорождённых могут быть связаны не только с гипервирулентными штаммами *K. pneumoniae*, но и с классическими, не обладающими множественной АБР и широким спектром генов патогенности [20]. Это обуславливает необходимость непрерывного молекулярно-эпидемиологического мониторинга штаммов *K. pneumoniae*, принадлежащих к разным патотипам, в микробиоте любых локусов новорождённых, матерей, медицинского персонала и объектов внешней среды в отделениях новорождённых педиатрических стационаров и перинатальных центров, изучение их свойств и интеграцию данных в единую российскую базу VGARus.

При анализе штаммов *K. pneumoniae* 2-й группы, выделенных в многопрофильном стационаре, установлено, что штаммы *K. pneumoniae* 3254, 3260 и 3263 имели идентичный спектр генов патогенности и АБР, а также одинаковый фенотип АБР. Данные штаммы принадлежали к ST395 и K39 и были отнесены к конвергентному патотипу ввиду наличия у них генов аэробактина и спектра бета-лактамаз и карбапенемаз. Штаммы были выделены как от больных, так и из внешней среды, что свидетельствует о циркуляции штаммов *K. pneumoniae* ST395 и K39 в стационаре. Наличие у *K. pneumoniae* 3263 кластера генов иерсиниобакина может объясняться процессами горизонтального переноса

данного гена, ассоциированного с транспозоном, и обладающего высокой мобильностью [21]. Штаммы *K. pneumoniae* 3255 и 3259 (ST395-K2) и *K. pneumoniae* 3245 и 3251 (ST395-K47) выделялись в единичных случаях только у больных, содержали в геномах гены аэробактина и детерминанты АБР и также были отнесены к конвергентному патотипу.

Таким образом, 7 из 10 штаммов, выделенных в многопрофильном стационаре, принадлежали к ST395, что могло бы быть расценено как свидетельство их циркуляции. Это согласуется с данными научной литературы о широком распространении штаммов данного ST, среди которых часто встречаются штаммы с выраженным патогенным потенциалом, способные вызывать тяжёлые системные инфекции [5, 17]. Однако углублённый анализ молекулярно-генетических свойств штаммов позволил установить их неоднородность даже в пределах одного ST и сделать вывод о циркуляции в стационаре только популяции штаммов *K. pneumoniae* ST395-K39.

Все остальные штаммы *K. pneumoniae*: 3256 (ST5209-K35), 3253 (ST 441-K62), 3247 (ST147-K64), были отнесены к классическим и выделялись в единичных случаях только у больных. Необходимо отметить, что в геноме штамма *K. pneumoniae* 3247 обнаружен ген Нью-Дели металло-бета-лактамазы *bla_{NDM-1}*, что объясняет высокую степень устойчивости этого штамма к антибиотикам. Известно, что данная детерминанта ассоциирована с плазмидами и способна к активному горизонтальному переносу [17], поэтому обнаружение такого штамма является неблагоприятным с эпидемиологической точки зрения, т. к. может привести к быстрому глобальному распространению полирезистентной популяции в стационаре.

В составе филогенетического древа все штаммы 2-й группы кластеризовались согласно ST и K-типам. Штаммы *K. pneumoniae* ST395 образовали 3 подкластера согласно их K-типам, 3 штамма *K. pneumoniae* ST395-K39 вошли в состав единого кластера, объединяющего штаммы, выделенные от больных и из внешней среды отделения МО (рис. 1).

Для изучения циркуляции штаммов *S. aureus* важное значение имеет анализ спектров генов патогенности, АБР, принадлежности к группе MRSA или MSSA (метициллин-чувствительные стафилококки), определения ST и spa-типа [22], который основан на анализе последовательности повторов гена поверхностного белка клеточной стенки стафилококка (белка A) [4]. При расследовании локальных вспышек заболеваемости установление spa-типа является важным этапом, так как с его помощью возможно установить различия между штаммами, принадлежащими к одному ST.

При проведении молекулярно-генетического анализа штаммов *S. aureus* III группы, ассоцииро-

ванных с КАИК, было установлено, что в геномах 7 штаммов *S. aureus* 2226, 3092, 3110, 2211, 3196, 3197 и 3198 присутствовала SCCmec кассета IV типа, они имели идентичные спектры генов патогенности, одинаковые фенотипы резистентности и принадлежали к ST8 t008.

Штаммы были выделены как от медицинского сотрудника, так и от больных с диагнозом КАИК, получавших амбулаторное лечение в гемодиализном центре и проходивших стационарное лечение в лечебно-профилактических МО города, что подтверждает факт их циркуляции. Различие штаммов по спектру детерминант *blaZ*, *ermC* и *cat* (рис. 2) может объясняться тем, что эти гены входят в состав плазмид и обладают высокой мобильностью [23–25]. По данным научной литературы, штаммы *S. aureus* ST8 t008 SCCmecIV являются распространёнными, часто связаны с ИСМП и выявляются на территории России с 1990-х гг. [4].

Штаммы *S. aureus* 3086, 3087, 3088 также идентичны по генам патогенности, детерминантам и фенотипу АБР. Они относились к группе MSSA, были типированы как *S. aureus* ST1 t127 и выделялись от 3 больных (место выхода перитонеального катетера). В то же время у этих же больных из перитонеальной жидкости были изолированы штаммы *S. aureus* других сиквенс-типов — ST5 (t688), ST97 (t267) и ST45 (t8416). Это свидетельствует о том, что популяция штаммов *S. aureus* ST1 t127 циркулирует в этой МО.

Все остальные изоляты *S. aureus* III группы были гетерогенны по спектру детерминант, фенотипу АБР, сиквенс-типам и spa-типам, что не позволяет оценить их эпидемиологическую значимость в данном исследовании.

Филогенетический анализ полногеномных последовательностей штаммов показал наличие пяти кластеров, объединяющих штаммы, принадлежащие к одинаковым сиквенс-типам и клональным комплексам (CC), которые представляют собой группы генетически близких сиквенс-типов. Штаммы *S. aureus* ST8, ST97, ST12, ST1 образовали самостоятельные группы (A, B, C, D), в состав единого крупного кластера E вошли штаммы *S. aureus* различных сиквенс-типов: ST6 и ST5, принадлежащие к пятому клональному комплексу (CC5), *S. aureus* ST4 и ST45, принадлежащие CC45, а также штаммы ST49, ST1027, ST707, ST398 и ST426, не принадлежащие к определенным клональным комплексам, но имеющие между собой филогенетическое родство (рис. 2).

Таким образом, в отделениях гемодиализа МО города и области были выделены штаммы *S. aureus* 13 различных сиквенс-типов и 19 spa-типов и показана циркуляция популяций эпидемических штаммов *S. aureus* MRSA (SCCmec IV) молекулярного типа ST8 t008 и *S. aureus* MSSA молекулярного типа ST1 t127.

Заключение

В результате проведенного исследования в МО Нижегородской области было выявлено большое генетическое разнообразие штаммов *K. pneumoniae* и *S. aureus*. Углублённый анализ показал циркуляцию в отделении новорожденных педиатрического стационара популяции классических штаммов *K. pneumoniae* ST3-K3, выделенных из желудочно-кишечного тракта детей, с оборудования и предметов ухода, содержащих ряд генов патогенности и бета-лактамазу *bla*_{SHV-1}.

В многопрофильном стационаре обнаружена циркуляция штаммов конвергентного патотипа *K. pneumoniae* ST395-K39, а также выявлены штаммы *K. pneumoniae* ST395-K2, ST395-K47, ST5209-K35, ST441-K62, ST147-K64, содержащие в геноме спектр генов патогенности и бета-лактамаз, в том числе Нью-Дели металло-бета-лактамазу *bla*_{NDM-1}, что может привести к формированию и распространению в стационаре полирезистентного клона, способного сменить циркулирующий возбудитель и привести к возникновению вспышек ИСМП.

В отделениях гемодиализа МО города и области выявлена циркуляция популяций *S. aureus* MRSA (SCCmec IV) ST8 t008 и *S. aureus* MSSA ST1 t127, а также обнаружены другие штаммы *S. aureus*, принадлежащие к 11 различным ST и 17 spa-типам, потенциально способные к формированию госпитальных клонов и широкому распространению в стационаре. В связи с этим с целью недопущения возникновения и распространения случаев ИСМП необходимо проведение в стационарах обязательного непрерывного микробиологического мониторинга, неотъемлемой частью которого должен являться молекулярно-эпидемиологический мониторинг, направленный на получение актуальной информации о генетических вариантах циркулирующих возбудителей, в том числе *K. pneumoniae* и *S. aureus*.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Зубков В.В., Любасовская Л.А., Рюмина И.И. и др. Микробиологический мониторинг в системе инфекционного контроля неонатальных стационаров. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2014;59(1):51–6. Zubkov V.V., Lyubasovskaya L.A., Ryumina I.I., et al. Microbiological monitoring of the infection control system of neonatal hospitals. *Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*. 2014;59(1):51–6. EDN: <https://elibrary.ru/rwimxh>
2. Михайловская В.С., Селиванова П.А., Кузнецова М.В. Распространённость генов *qacEΔ1*, *qacE*, *oqxA*, *oqxB*, *acrA*, *cepA* и *zitB* среди мультирезистентных *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в кардиохирургическом стационаре. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(4):502–11. Mihailovskaya V.S., Selivanova P.A., Kuznetsova M.V. Prevalence of *qacEΔ1*, *qacE*, *oqxA*, *oqxB*, *acrA*, *cepA* and *zitB* genes among multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated in a cardiac hospital. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2024;101(4):502–11. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-548> EDN: <https://elibrary.ru/fcoyce>

3. Новикова И.Е., Садеева З.З., Алябьева Н.М. и др. Антибиотикорезистентность и вирулентность карбапенем-устойчивых штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных у детей в реанимационных и хирургических отделениях. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(4):321–32. Novikova I.E., Sadeeva Z.Z., Alyabyeva N.M., et al. Antimicrobial resistance and virulence of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from children in intensive care and surgical units. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2023;100(4):321–32.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-373>
EDN: <https://elibrary.ru/rmjxsl>
4. Романов А.В., Дехнич А.В., Эйдельштейн М.В. Молекулярная эпидемиология штаммов *Staphylococcus aureus* в детских стационарах России. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2012;14(3):201–8. Romanov A.V., Dekhnich A.V., Edelstein M.V. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* in Russian pediatric hospitals. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2012;14(3):201–8.
EDN: <https://elibrary.ru/pcnnlp>
5. Воронина О.Л., Кунда М.С., Рыжова Н.Н. и др. Геномные особенности резистентных изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из кровяного русла и ликвора пациентов детского стационара. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(6):399–409. Voronina O.L., Kunda M.S., Ryzhova N.N., et al. Genomic features of resistants *Klebsiella pneumoniae*, isolated from the bloodstream and cerebrospinal fluid of pediatric hospital patients. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2023;100(6):399–409.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-430>
EDN: <https://elibrary.ru/ylxbdz>
6. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012;19(5):455–77.
DOI: <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
7. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. 2014;30(14):2068–9.
DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
8. Chen L.H., Yang J., Yu J., et al. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(1):325–8.
DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gki008>
9. Bortolaia V., Kaas R.S., Ruppe E., et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J. Antimicrob. Chemother.* 2020;75(12):3491–500.
DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>
10. Jolley K.A., Bray J.E., Maiden M.C.J. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res.* 2018;3:124.
DOI: <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>
11. Guo C., Yang X., Wu Y., et al. MLST-based inference of genetic diversity and population structure of clinical *Klebsiella pneumoniae*, China. *Sci. Rep.* 2015;5:7612.
DOI: <https://doi.org/10.1038/srep07612>
12. Bartels M.D., Petersen A., Worning P., et al. Comparing whole-genome sequencing with Sanger sequencing for spa typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 2014;52(12):4305–8.
DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.01979-14>
13. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009;53(12):4961–7.
DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.00579-09>
14. Treangen T.J., Ondov B.D., Koren S., et al. The Harvest suite for rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific microbial genomes. *Genome Biol.* 2014;15(11):524.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0524-x>
15. Letunic I., Bork P. Interactive tree of life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(W1):293–6.
DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>
16. Брико Н.И., Брусина Е.Б., Зуева Л.П. и др. Госпитальный штамм – непознанная реальность. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2013;1(1):30–5. Briko N.I., Brusina E.B., Zueva L.P., et al. Hospital strain — a mysterious reality. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2013;1(1):30–5.
EDN: <https://elibrary.ru/pvsumn>
17. Агеев В.А., Агеев И.В., Сидоренко С.В. Конвергенция множественной резистентности и гипervирулентности у *Klebsiella pneumoniae*. *Инфекция и иммунитет*. 2022;12(3):450–60. Ageevets V.A., Ageevets I.V., Sidorenco S.V. Convergence of multiple resistance and hypervirulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2022;12(3):450–60.
DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-COM-1825>
EDN: <https://elibrary.ru/ucpmnf>
18. Комисарова Е.В., Воложанцев Н.В. Гипervирулентная *Klebsiella pneumoniae* — новая инфекционная угроза. *Инфекционные болезни*. 2019;17(3):81–9. Komisarova E.V., Volozhantsev N.V. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: a new infectious threat. *Infectious diseases*. 2019;17(3):81–9.
DOI: <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2019-3-81-89>
EDN: <https://elibrary.ru/idonjy>
19. Ali M.R., Yang Y., Dai Y., et al. Prevalence of multidrug-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* without defined hypervirulent biomarkers in Anhui, China: a new dimension of hypervirulence. *Front. Microbiol.* 2023;14:1247091.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1247091.8>
20. Устюжанин А.В., Маханёк А.А., Чистякова Г.Н. и др. Сравнительный геномный анализ клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от новорождённых детей с различными исходами инфекционного процесса в неонатальном периоде. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2025;102(1):62–71. Ustyuzhanin A.V., Makhanyok A.A., Chistyakova G.N. et al. Comparative genomic analysis of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* isolated from newborns with different outcomes of the infectious process in the neonatal period. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2025;102(1):62–71.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-544>
EDN: <https://elibrary.ru/zxmnbq>
21. Самойлова А.А., Краева Л.А., Михайлов Н.В. и др. Геномный анализ вирулентности и антибиотикорезистентности штаммов *Klebsiella pneumoniae*. *Инфекция и иммунитет*. 2024;14(2):339–50. Samoylova A.A., Kraeva L.A., Mikhailov N.V., et al. Genomic analysis of virulence and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* strains. *Infection and Immunity*. 2024;14(2):339–50.
DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-GAO-15645>
EDN: <https://elibrary.ru/cmtxuz>
22. Скачкова Т.С., Замятин М.Н., Орлова О.А. и др. Мониторинг метициллинрезистентных штаммов стафилококка в многопрофильном стационаре Москвы с помощью молекулярно-биологических методов. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2021;20(1):44–50. Skachkova T.S., Zamyatin M.N., Orlova O.A., et al. Monitoring of methicillin-resistant staphylococcal strains in the Moscow medical and surgical center using molecular biological methods. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2021;20(1):44–50.
DOI: <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-1-44-50>
EDN: <https://elibrary.ru/fwncis>
23. Якубцевич Р.Э., Лемеш А.В., Кирячков Ю.Ю. Патогенетические механизмы формирования генетической устойчивости

чивости к антибиотикам при лечении тяжелых инфекций в интенсивной терапии. *Журнал Гродненского государственного медицинского университета*. 2021;19(3):255–62. Yakubtsevich R.E., Lemesh A.V., Kiryachkov Yu. Yu. Pathogenic mechanisms of formation of genetic resistance to antibiotics in the treatment of severe infections in intensive care. *Journal of the Grodno State Medical University*. 2021;19(3):255–62. DOI: <https://doi.org/10.25298/2221-8785-2021-19-3-255-262> EDN: <https://elibrary.ru/tqhgvg>

Информация об авторах

Соловьева Ирина Владленовна — д-р биол. наук, доцент, в. н. с., зав. лаб. микробиома человека и средств его коррекции ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия, lab-lb@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3136-9500>

Точили́на Анна Георгиевна[✉] — канд. биол. наук, доцент, с. н. с. лаб. микробиома человека и средств его коррекции ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия, lab-lb@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7753-5730>

Белова Ирина Викторовна — канд. мед. наук, доцент, в. н. с. лаб. микробиома человека и средств его коррекции ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия, lab-lb@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3402-1160>

Зайцева Наталья Николаевна — д-р мед. наук, директор ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия, nniem@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5370-4026>

Кучеренко Наталия Сергеевна — руководитель Управления Роспотребнадзора по Нижегородской области, Нижний Новгород, Россия, sanepid@sinn.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0509-3459>

Садькова Наталья Александровна — заместитель руководителя Управления Роспотребнадзора по Нижегородской области, Нижний Новгород, Россия, sanepid@sinn.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9412-8678>

Молодцова Светлана Борисовна — н. с. лаб. микробиома человека и средств его коррекции ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия, lab-lb@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4750-5925>

Кропотов Василий Сергеевич — канд. биол. наук, с. н. с. лаб. микробиома человека и средств его коррекции ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия, lab-lb@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6903-962X>

Участие авторов: Соловьева И.В. — общее руководство проектом, разработка концепции и дизайна исследования, написание и редактирование текста; Точили́на А.Г., Белова И.В. — подбор и анализ литературы, систематизация и анализ данных, написание текста; Зайцева Н.Н. — общее руководство проектом, разработка концепции исследования, редактирование текста; Кучеренко Н.С., Садькова Н.А. — организация сбора данных, разработка дизайна исследования, редактирование текста; Молодцова С.Б. — проведение микробиологических исследований, написание текста; Кропотов В.С. — проведение биоинформатической обработки данных, написание текста. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 26.07.2025;
принята к публикации 01.10.2025;
опубликована 31.10.2025

24. Malachowa N., DeLeo F.R. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell Mol. Life Sci.* 2010;67(18):3057–71. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0389-4>
25. Schwarz S., Cardoso M. Nucleotide sequence and phylogeny of a chloramphenicol acetyltransferase encoded by the plasmid pSCS7 from *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991;35(8):1551–6. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.35.8.1551>

Information about the authors

Irina V. Solovyeva — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Head, Laboratory of the human microbiome and means of its correction, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia, lab-lb@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3136-9500>

Anna G. Tochilina[✉] — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of the human microbiome and means of its correction, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia, lab-lb@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7753-5730>

Irina V. Belova — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of the human microbiome and means of its correction, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia, lab-lb@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3402-1160>

Natalya N. Zaitseva — D. Sci. (Med.), Director, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia, nniem@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5370-4026>

Natalia S. Kucherenko — Head, Department of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare in the Nizhny Novgorod Region, Nizhny Novgorod, Russia, sanepid@sinn.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0509-3459>

Natalia A. Sadykova — Deputy Head, Department of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare in the Nizhny Novgorod Region, Nizhny Novgorod, Russia, sanepid@sinn.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9412-8678>

Svetlana B. Molodtsova — researcher, Laboratory of the human microbiome and means of its correction, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia, lab-lb@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4750-5925>

Vasily S. Kropotov — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of the human microbiome and means of its correction, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia, lab-lb@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6903-962X>

Authors' contribution: Soloveva I.V. — overall project management, development of the research concept and design, writing and editing the text; Tochilina A.G., Belova I.V. — literature selection and analysis, data organization and analysis, writing the text; Zaitseva N.N. — overall project management, development of the research concept, text editing; Kucherenko N.S., Sadykova N.A. — organization of data collection, development of the research design, text editing; Molodtsova S.B. — conducting microbiological studies, writing the text; Kropotov V.S. — performing bioinformatics data processing, writing the 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 26.07.2025;
accepted for publication 01.10.2025;
published 31.10.2025



Комбинированная ДНК-белковая вакцина, содержащая полиэпитопный Т-клеточный иммуноген и рецептор-связывающий домен белка S вируса SARS-CoV-2

Боргоякова М.Б.[✉], Рудомётов А.П., Старостина Е.В., Яковлев В.А., Тигеева Е.В.,
Зайковская А.В., Волосникова Е.А., Меркульева Ю.А., Исаева А.А., Несмеянова В.С.,
Шаньшин Д.В., Зайцев Б.Н., Кисаков Д.Н., Кисакова Л.А., Щербаков Д.Н.,
Карпенко Л.И., Ильичёв А.А.

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

Аннотация

Введение. В период пандемии COVID-19 стала чрезвычайно актуальной разработка профилактических вакцин, в том числе основанных на новых платформах. Одной из таких платформ являются комбинированные вакцины, сочетающие в одном препарате, например, ДНК и белковые компоненты.

Целью данной работы являлось исследование иммуногенности ДНК-вакцины, кодирующей полиэпитопный Т-клеточный иммуноген вируса SARS-CoV-2, в сочетании с рекомбинантным белком RBD (рецепторсвязывающий домен белка S вируса SARS-CoV-2, штамм Wuhan-Hu-1), конъюгированным с поликатионным носителем — полиглиокин-спермидином (PGS), а также оценка вклада отдельных компонентов в развитие иммунного ответа у мышей линии BALB/c.

Материалы и методы. Для создания ДНК-вакцины (pBSI-COV-Ub) мы воспользовались стратегией дизайна искусственного полиэпитопного иммуногена, состоящего из консервативных иммунодоминантных фрагментов различных структурных белков вируса SARS-CoV-2, содержащих большое количество эпитопов Т-лимфоцитов: хелперных и цитотоксических. Рекомбинантный белок RBD был конъюгирован с поликатионом PGS, в результате смешивания его с ДНК образовывал вакцинный комплекс CCV–BSI, иммуногенные свойства которого были исследованы в данной работе.

Результаты. Иммунизация мышей линии BALB/c комбинированной конструкцией CCV–BSI привела к индукции высоких титров антител, обладающих нейтрализующей активностью в отношении живого вируса SARS-CoV-2, а также к формированию вирус-специфического Т-клеточного ответа, что было показано с помощью иммуноферментного анализа, реакции нейтрализации и ELISpot. Показано, что вклад в гуморальный иммунный ответ вносит именно белковый компонент, а в клеточный — ДНК. Введение рекомбинантного белка RBD привело к индукции только антител, введение ДНК-вакцины — к индукции только Т-клеточного ответа, введение комбинированного препарата — к индукции и гуморального иммунного ответа, и специфических Т-клеток.

Выводы. Уникальная комбинация ДНК и белка в составе одной вакцинной конструкции позволяет преодолеть ограничения каждого из данных типов вакцин и приводит к индукции обоих звеньев иммунитета. Белковый компонент может быть заменён в соответствии с актуальным вирусным штаммом, а универсальный Т-клеточный иммуноген может обеспечить ответ на широкий спектр циркулирующих вариантов. Данная платформа в дальнейшем может быть использована для разработки вакцин против различных вирусов с высокой изменчивостью.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, ДНК-вакцины, субъединичные вакцины, иммуногенность, искусственный Т-клеточный иммуноген

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с принципами гуманности, изложенными в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации. Протоколы были одобрены на заседаниях Биоэтической комиссии ГНЦ ВБ «Вектор» (протокол № 1 от 21.03.2023).

Источник финансирования. Исследование было выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение от 30.05.2025 № 075-15-2025-526).

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

Для цитирования: Боргоякова М.Б., Рудомётов А.П., Старостина Е.В., Яковлев В.А., Тигеева Е.В., Зайковская А.В., Волосникова Е.А., Меркульева Ю.А., Исаева А.А., Несмеянова В.С., Шаньшин Д.В., Зайцев Б.Н., Кисаков Д.Н., Кисакова Л.А., Щербаков Д.Н., Карпенко Л.И., Ильичёв А.А. Комбинированная ДНК-белковая вакцина, содержащая полиэпитопный Т-клеточный иммуноген и рецептор-связывающий домен белка S вируса SARS-CoV-2. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2025;102(5):571–582.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-691>

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

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-691>

DNA-protein COVID-19 combination vaccine containing multiepitope T-cell immunogen and receptor binding domain of the SARS-CoV-2 S protein

Mariya B. Borgoyakova[✉], Andrey P. Rudometov, Ekaterina V. Starostina, Vladimir A. Yakovlev, Elena V. Tigeeva, Anna V. Zaykovskaya, Ekaterina A. Volosnikova, Iuliia A. Merkuleva, Anastasya A. Isaeva, Valentina S. Nesmeyanova, Daniil V. Shanshin, Boris N. Zaitsev, Denis N. Kisakov, Lyubov A. Kisakova, Dmitry N. Shcherbakov, Larisa I. Karpenko, Alexander A. Ilyichev

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

Abstract

Introduction. During the COVID-19 pandemic, the development of preventive vaccines, including those based on new platforms, became extremely relevant. One such platform is vaccines, which combine, for example, DNA and protein components into a single vaccine.

The aim of this study was to investigate the immunogenicity of a DNA vaccine encoding a polypeptidic T-cell immunogen of the SARS-CoV-2 virus, combined with the recombinant RBD protein (the receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 virus S protein, Wuhan-Hu-1 strain) conjugated to a polycationic carrier – polyglutinin-spermidine (PGS), and to assess the contribution of individual components to the development of an immune response in BALB/c mice.

Materials and methods. To create the DNA vaccine (pBSI-COV-Ub), we used a strategy of designing an artificial polypeptide immunogen consisting of conserved immunodominant fragments of various structural proteins of the SARS-CoV-2 virus, containing a large number of T-lymphocyte epitopes: helper and cytotoxic. The recombinant RBD protein was conjugated with the polycation PGS, and upon mixing it with DNA, it formed the vaccine complex CCV–BSI, whose immunogenic properties were investigated in this work.

Results. Immunization of BALB/c mice with the CCV–BSI combined construct resulted in the induction of high antibody titers with neutralizing activity against live SARS-CoV-2 virus, as well as the formation of a virus-specific T-cell response, as demonstrated by ELISA, neutralization assay and ELISpot. It has been shown that the protein component contributes to the humoral immune response, while DNA contributes to the cellular immune response. Administration of the recombinant RBD protein led to the induction of only antibodies, administration of the DNA vaccine led to the induction of only a T-cell response, and administration of the combined preparation led to the induction of both a humoral immune response and specific T cells.

Conclusion. The unique combination of DNA and protein within a single vaccine construct allows for overcoming the limitations of each of these vaccine types and leads to the induction of both arms of immunity. The protein component can be replaced according to the current viral strain, and a universal T-cell immunogen can provide a response to a wide range of circulating variants. This platform can be further used to develop vaccines against various highly variable viruses.

Keywords: SARS-CoV-2, DNA vaccines, subunit vaccines, immunogenicity, artificial T-cell immunogen

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with the principles of humanity set out in the Directives of the European Community (86/609/EEC) and the Helsinki Declaration. The research protocol was approved by the Bioethical Commission of the State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» (protocol No. 1, March 21, 2023).

Funding source. The study was carried out with the support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement No. 075-15-2025-526 dated 05/30/2025).

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

For citation: Borgoyakova M.B., Rudometov A.P., Starostina E.V., Yakovlev V.A., Tigeeva E.V., Zaykovskaya A.V., Volosnikova E.A., Merkuleva I.A., Isaeva A.A., Nesmeyanova V.S., Shanshin D.V., Zaitsev B.N., Kisakov D.N., Kisakova L.A., Shcherbakov D.N., Karpenko L.I., Ilyichev A.A. DNA-protein COVID-19 combination vaccine containing multiepitope T-cell immunogen and receptor binding domain of the SARS-CoV-2 S protein. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(5):571–582.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-691>

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

Введение

Пандемия COVID-19 привела к принятию беспрецедентных мер в области мирового здравоохранения. В частности, для массовой вакцинопрофилактики в условиях чрезвычайной ситуации были одобрены вакцины, основанные на инновационных подходах: мРНК-вакцины [1], ДНК-вакцины [2], вакцины на основе вирусных векторов [3, 4]. Установлено, что вакцины данных типов способны приводить к индукции Т-клеточных ответов, важных для противостояния вирусной инфекции.

Для родственных SARS-CoV-2 вирусов SARS-CoV (коронавирус, вызывающий острый респираторный синдром) и MERS-CoV (коронавирус, вызывающий ближневосточный респираторный синдром) было показано, что вирус-специфический Т-клеточный ответ сохраняется спустя десятилетия, тогда как нейтрализующие титры сывороток значительно падают уже через полгода после перенесённого заболевания [5, 6]. Снижение нейтрализующей активности сывороток показано и при появлении новых штаммов вируса SARS-CoV-2 [7]. Стоит отметить, что долго сохраняющийся Т-клеточный ответ является специфичным не только к основному антигену — гликопротеину S, главной мишени гуморального иммунного ответа, но и к другим белкам, обычно не используемым в качестве иммуногенов в субъединичных вакцинах [8]. Поскольку белки N, М, Е и другие меньше подвержены накоплению мутаций [9], то их последовательности более консервативны [10], и Т-клеточный иммунный ответ, направленный на их эпитопы, может быть специфичным в отношении вновь возникающих штаммов [11]. Актуальна стратегия создания искусственных Т-клеточных полиэпитопных иммуногенов, содержащих иммунодоминантные эпитопы вирусных/бактериальных/опухолевых белков, узнаваемые CD4⁺- и CD8⁺-Т-клетками. Платформа ДНК-вакцин способна обеспечить стимуляцию цитотоксических и Т-хелперных лимфоцитов за счёт внутриклеточного синтеза и процессинга иммуногена с последующей презентацией его антигенпрезентирующими клетками в комплексе с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) I и II классов.

Однако в случае SARS-CoV-2 не стоит забывать о важности гуморального иммунного ответа, т. е. высокие титры нейтрализующих антител коррелируют с эффективностью вакцины [12]. Наиболее подходящими иммуногенами, индуцирующими выработку антител, являются рекомбинантные белки [13]. Они ограничены в стимуляции специфического цитотоксического ответа, но активируют В-клетки и Т-хелперы, особенно хорошо в присутствии адъювантов [14]. Такими адъювантами могут быть соли алюминия, различные эмульсии, полисахариды. Один из наиболее изученных α -глобулинов, который используется для доставки лекарств, — полиглюкин

(высокомолекулярный декстран) [15]. Полиглюкин обеспечивает пролонгированное высвобождение активного вещества, а также является иммуномодулятором, в результате чего работает в качестве адъюванта. Благодаря наличию гидроксильных групп полиглюкин легко подвергается модификации, в частности присоединению веществ, содержащих аминокислоты, таких как белки [16].

Объединение разных типов иммуногенов (ДНК и белок) в одной конструкции представляется перспективным подходом, позволяющим преодолеть ограничения каждого из данных типов вакцин и привести к индукции обоих звеньев иммунитета. В большинстве работ, в которых исследуется возможность комбинирования разных иммуногенов, иммунизация проводится с применением прайм-буст-стратегий, при которых чаще всего первую иммунизацию проводят ДНК-вакциной, а бустерную — белком в комплексе с адъювантом [17]. В некоторых работах показано, что совместное введение ДНК и белка приводит к увеличению иммуногенности как по сравнению с группами, получающими компоненты в отдельности, так и с группами, получающими вакцины в системе прайм-буст [18–21]. Так, введение смеси ДНК-вакцины, кодирующей S-белок вируса SARS-CoV-2, и рекомбинантного белка S в сочетании с адъювантом в виде алюминиевых квасцов привело к формированию выраженного защитного иммунного ответа у сирийских хомячков, значительно превышающего значения в группах животных, иммунизированных отдельными компонентами [21]. Также было показано, что одновременное введение ДНК и белка в одно и то же место является более эффективным, чем введение их одновременно, но в разные места (например, в разные лапы) [19].

Для других вакцин, индуцирующих Т-клеточный ответ, таких как мРНК или векторные вакцины, совместное введение с белком в работах не встречается, однако есть исследования, посвящённые положительному эффекту бустирования иммунного ответа на данные типы вакцин субъединичными препаратами [22–25].

Целью данной работы являлось исследование иммуногенности ДНК-вакцины, кодирующей полиэпитопный Т-клеточный иммуноген вируса SARS-CoV-2, в сочетании с рекомбинантным белком RBD (рецептор-связывающий домен белка S вируса SARS-CoV-2), конъюгированным с поликатионным носителем — полиглюкин-спермидином (PGS), а также оценка вклада отдельных компонентов в развитие иммунного ответа у мышей линии BALB/c.

Материалы и методы

Конструирование ДНК-вакцины pBSI-COV

В качестве ДНК-компонента использовали полученную нами ранее плазмиду pBSI-CoV-Ub [26].

Предсказание Т-клеточных эпитопов было выполнено с использованием программы NetMHCspan-4.1 и базы данных Immune Epitope Database 2.22, IEDB 2.22. В качестве анализируемых последовательностей из GenBank были взяты последовательности белков S, N, М и E (GenBank MN908947), полученные в результате секвенирования вируса SARS-CoV-2 штамма Wuhan-Hu-1. Фрагменты, выбранные для исследования, анализировали на консервативность, используя базу данных GISAID, затем их объединили последовательно в одну конструкцию, к N-концу добавили убиквитин и эпитоп PADRE (Pan DR Epitope, универсальный Т-хелперный эпитоп, усиливающий индукцию CD4⁺-Т-клеток, регулирующих В-клетки и цитотоксические Т-лимфоциты), к С-концу — маркерный эпитоп EPFRDYVDRFYKTLR. Кодировующую генетическую последовательность оптимизировали для эффективной трансляции в клетках млекопитающих с помощью программы Jcat (<http://www.jcat.de>). Синтез гена был проведён фирмой «ДНК-синтез». Клонирование в вектор pVAX1 провели по сайтам PspI и ApaI.

Экспрессию целевого гена оценивали с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и иммуноблотинга [26].

Получение комбинированного ДНК-белкового препарата

Белок RBD и его конъюгат с PGS были получены, как описано ранее [27]. В качестве источника последовательности RBD использовали геномные данные изолята Wuhan-Hu-1 (GenBank: MN908947.3). Комбинированный ДНК-белковый препарат получали путём смешивания 2 частей плазмидной ДНК с 1 частью белка RBD, конъюгированного с PGS (в массовом соотношении ДНК и белка), а затем добавляли избыток PGS в массовом соотношении 1 : 10 относительно ДНК. Формирование комплексов оценивали по смещению электрофоретической подвижности в 1% агарозном геле, а также с помощью электронной микроскопии: окрашивание 2% водным раствором уранилацетата, микроскоп «JEM-1400» («Jeol»).

Иммунизация животных, подготовка образцов

Работу с животными проводили согласно «Руководству по уходу и использованию лабораторных животных» и принципам гуманности, изложенным в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации. Протоколы были одобрены Биоэтической комиссией ГНЦ ВБ «Вектор» (протокол № 1 от 21.03.2023).

Для оценки иммуногенности созданных конструкций использовали самок мышей BALB/c массой 16–18 г, полученных из питомника ГНЦ ВБ «Вектор». Животных разделили на группы по 6 мы-

шей и иммунизировали внутримышечно дважды с интервалом 3 нед. Каждая мышь получала 200 мкл инъекционного препарата в обе бедренные мышцы задних лап (по 100 мкл в каждую):

- группа CCV–BSI — комбинированный препарат, содержащий 100 мкг ДНК и 50 мкг белка;
- группа pBSI-COV-Ub — 100 мкг плазмиды;
- группа RBD–PGS — 50 мкг белка RBD, конъюгированного с PGS;
- группа интактные — неиммунизированные животные.

Спустя 2 нед после 2-й иммунизации у мышей брали кровь для анализа гуморального иммунного ответа и селезёнки для анализа клеточного ответа.

Сыворотки отделяли от клеточных элементов центрифугированием (9000g, 15 мин), прогревали 30 мин при 56°C и исследовали на наличие антител, специфически связывающихся с белком RBD в иммуноферментном анализе (ИФА), а также анализировали их вируснейтрализующую активность.

Селезёнки последовательно измельчали на нейлоновых фильтрах для клеток с диаметром пор 70 и 40 мкм («JET Biofil»). Подготовку спленоцитов проводили, как описано ранее [27].

Иммуноферментный анализ

Рекомбинантный белок RBD сорбировали на 96-луночные планшеты («Nunc») в 2М мочеви-не при 4°C в течение ночи (1 мкг/мл). Постановку ИФА проводили, как описано ранее [27]. Результаты анализировали при длине волны 450 нм с помощью спектрофотометра «Feyond A-300» («Allsheng»).

Реакция вируснейтрализации

Нейтрализующие свойства антител сывороток крови анализировали в реакции ингибирования цитопатического действия вируса на культуре клеток *in vitro*, как описано ранее [27]. В работе использовали штамм коронавируса SARS-CoV-2 nCoV/Victoria/1/2020, полученный из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ГНЦ ВБ «Вектор». Нейтрализующую активность сывороток иммунизированных животных оценивали по разведению сывороток, при котором регистрировали защиту клеток от цитопатического действия вируса в 50% лунок.

ELISpot

ELISpot проводили с использованием набора ELISpot Plus: Mouse IFN-γ (ALP) («Mabtech») по инструкции производителя. Спленоциты пассивировали в количестве $2,5 \times 10^5$ клеток/луночка и добавляли к ним среду RPMI с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (для отрицательного контроля), или смесь вирус-специфических пептидов в концентрации 20 мкг/мл для каждого пептида, или конканна-

валин А (для положительного контроля). Подсчёт спотов производили визуально с использованием ELISpot-ридера («Carl Zeiss»). Единицу образования пятен (SFU) на 10^6 клеток рассчитывали путём вычитания значений в лунках с отрицательным контролем.

Пептиды для стимуляции определяли с помощью инструментов IEDB Analysis Resource и синтезировали в компании «AtaGenix Laboratories». Более 80% составила чистота пептидов: VYAWNRRKRI, FERDISTEI, CGPKKSTNL, RFASVYAWNRRKRISN, VGGNYNYLYRLFRKS, GGNVNYLYRLFRKSN, YNYKLPDDFTGCVIA, KNKCVNFNFNGLTGT, QPTESIVRF, VSPTKLNLDL, LLHAPATVCGPKKST, ASVYAWNRRKRISN, YNYLYRLFRKSNL, AYSNNSIAI, QYIKWPWYI, LPPLLTDEM, SAPHGVVFL, WPWYIWLGF, YYRRATRRIRGGDGK, GTWLTYTGAIKLDK, DDQIGYYRRATRRIR, VKPSFYVYSRVKNLN, CFVLAAYRINWITG, YYRRATRRIR, TPSGTWLTG, KHIDAYKTF, SPDDQIGYY.

Статистическая обработка

Данные были проанализированы с помощью программного обеспечения «GraphPadPrism 6.0». Различия между группами определяли с использованием непараметрического метода Манна–Уитни, при $p < 0,05$ различия считали значимыми.

Результаты

Дизайн искусственного полиэпитопного Т-клеточного иммуногена

Дизайн Т-клеточного иммуногена осуществляли с использованием подхода, позволяющего выбрать иммунодоминантные эпитопы, а затем объединить их в одну последовательность. По итогам анализа были выбраны 5 фрагментов из белка S, по 2 фрагмента из белков М и N, 1 фрагмент из белка Е, которые содержат наибольшее количество $CD4^+$ и $CD8^+$ -эпитопов, рестриктурируемых молекулами МНС I и II классов человека и мыши. Анализ гомологичности данных фрагментов для разных штаммов вируса, включая актуальные для 2024 г. варианты, показал высокую степень их консервативности (85,4–100%). К конструкции для увеличения эффективности внутриклеточного процессинга синтезируемого белка была добавлена последовательность, кодирующая убиквитин. Аминокислотные последовательности выбранных фрагментов и общая структура иммуногена представлены на **рис. 1**. Сконструированный иммуноген назван BSI-COV-Ub.

Плазмида pBSI-COV-Ub (**рис. 2, а**) была разработана в препаративных количествах и охарактеризована ранее [26]. С помощью ОТ-ПЦР и вестерн-блоттинга определили экспрессию целево-



Рис. 1. Схематическое изображение искусственного полиэпитопного Т-клеточного иммуногена BSI-COV-Ub, составленного из фрагментов белков вируса SARS-CoV-2.

го гена, кодирующего искусственный иммуноген BSI-COV-Ub, на уровне РНК и белка. По данным ОТ-ПЦР, размеры амплифицированного фрагмента составили ~ 1470 п. о., что соответствует теоретически рассчитанному фрагменту при использовании специфических праймеров (рис. 2, б). С помощью иммуоблоттинга выявили дискретные белки, из которых продукт с наибольшей массой соответствовал теоретически рассчитанному продукту гена *bsi-cov-ub* (54,5 кДа; рис. 2, в). Наличие «лесенки» из дискретных белков свидетельствует об эффективном процессинге Т-клеточного иммуногена в клетке.

Рекомбинантный белок RBD и его конъюгат с PGS были наработаны, очищены и охарактеризованы ранее [27].

Получение комплекса ДНК–белок

Получение комбинированного комплекса из ДНК и конъюгата RBD–PGS проводили путём смешивания компонентов, схема их взаимодействия в смеси представлена на рис. 3, а. Формирование комплекса определяли по изменению электрофоретической подвижности плазмидной ДНК в агарозном геле: инкапсулированная плазмида демонстрировала значительно меньшую подвижность в электрическом поле по сравнению с «голой плазмидой» (рис. 3, б).

С помощью электронной микроскопии (рис. 3, в) было показано, что размеры частиц находятся в диапазоне 50–200 нм. Ряд исследователей предполагают, что наночастицы подобных размеров оптимальны для создания вакцин, поскольку они накапливаются в В-клеточных фолликулах и вызывают сильный иммунный ответ [28].

Анализ гуморального иммунного ответа

Для оценки иммуногенности созданных вакцинных конструкций мышей BALB/с иммунизиро-

вали дважды в дни 0, 21 и в конечной точке (день 35), производили забор сывороток для анализа. Сыворотки тестировали на наличие RBD-специфических антител с помощью ИФА, а также на способность нейтрализовать живой вирус. В качестве контролей использовали сыворотки мышей, иммунизированных плазмидной ДНК pBSI-COV-Ub и белком RBD, конъюгированным с PGS, а также сыворотки интактных мышей (рис. 4, а).

По результатам RBD-специфического ИФА через 2 нед после 2-й иммунизации средние титры специфических антител у животных, иммунизированных комбинированной вакциной CCV–BSI, сочетающей в себе белок и ДНК, составили 1 : 1 557 215. В группе, иммунизированной белком RBD, конъюгированным с PGS, средний титр составил 1 : 391 951, что достоверно не отличается от первой группы ($p = 0,2739$). В сыворотках мышей, получавших только плазмиду pBSI-COV-Ub, и в сыворотках интактных животных антитела, специфически связывающиеся с белком RBD, были обнаружены на уровне фона (рис. 4, б).

Результаты анализа нейтрализующих свойств сывороток с использованием штамма nCoV/Victoria/1/2020 вируса SARS-CoV-2 на культуре клеток *in vitro* также показали отсутствие значимых различий между группами, иммунизированными комбинированной конструкцией CCV–BSI и белком RBD, конъюгированным с PGS: средние нейтрализующие титры составили 1 : 238 и 1 : 263 соответственно ($p = 0,7780$). Сыворотки животных, получавших только плазмиду pBSI-COV-Ub, и сыворотки интактных животных не проявили вирус-нейтрализующей активности (рис. 4, в).

Анализ клеточного иммунного ответа

Для оценки способности созданных конструкций индуцировать клеточный иммунитет у мышей

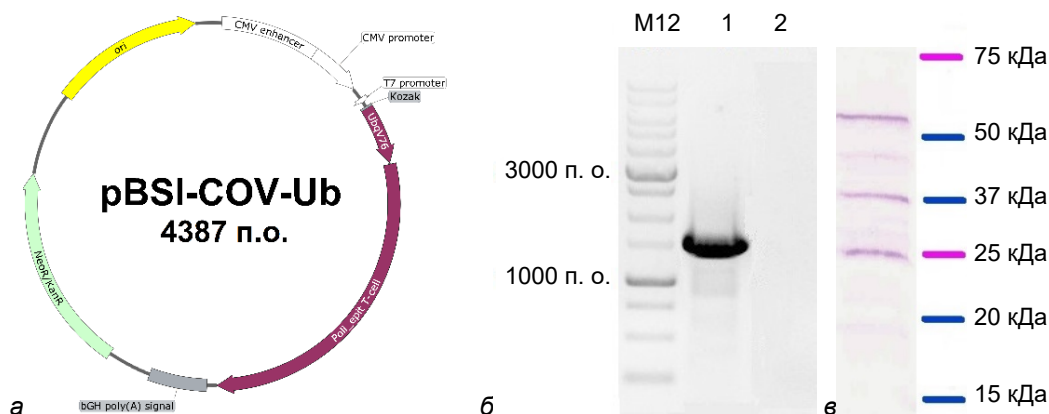


Рис. 2. Структура плазмиды pBSI-CoV-Ub (а) и анализ экспрессии целевого гена после трансфекции клеток HEK293Т. б — продукты ОТ-ПЦР с использованием тотальной РНК клеток HEK293Т, трансфицированных плазмидой pBSI-CoV-Ub (дорожка 1) (электрофорез в 1% агарозном геле). На дорожке 2 — продукты ПЦР, поставленных на препарате тотальной РНК без обратной транскрипции. в — белковые продукты, выявленные в трансфицированных плазмидой pBSI-CoV-Ub клетках HEK293Т методом иммуноблоттинга с использованием моноклонального 29F2 к маркерному эпитопу.

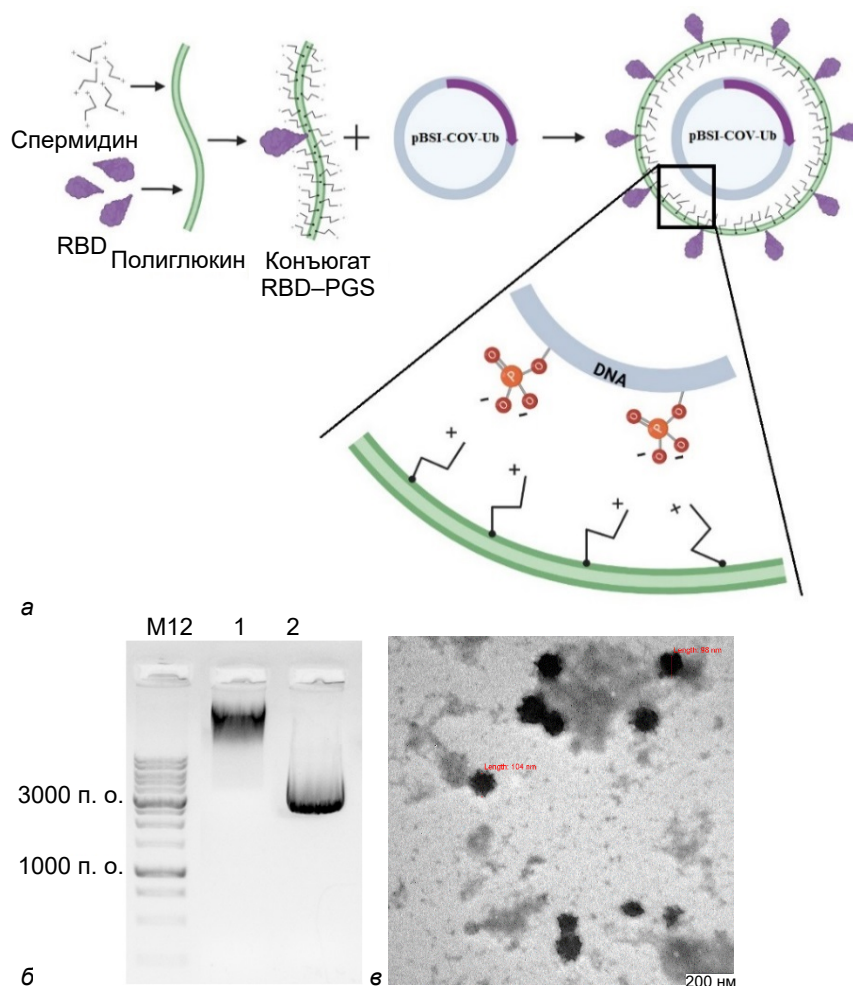


Рис. 3. Комплекс ДНК–белок.

а — схематическое представление комплекса: отрицательные группы остатков фосфорной кислоты в составе плазмидной ДНК электростатически связываются с положительными аминогруппами в составе спермидина, конъюгированного с полиглюкином.

б — подтверждение инкапсуляции ДНК в оболочке RBD–PGS с помощью электрофореза в 1% агарозном геле:

1 — CCV-BSI; 2 — pBSI-COV-Ub.

в — электронные микрофотографии частиц CCV-BSI.

в конечной точке эксперимента брали селезёнки, которые были гомогенизированы и исследованы с помощью метода ELISpot. В качестве контролей использовали спленоциты мышей, иммунизированных плазмидной ДНК pBSI-COV-Ub и белком RBD, конъюгированным с PGS, а также спленоциты интактных мышей. Ответ оценивали по способности спленоцитов отвечать выделением интерферона- γ (IFN- γ) на специфическую стимуляцию, которую осуществляли пулом пептидов, входящих в состав белка RBD и иммуногена BSI-COV-Ub (рис. 5, а).

С помощью ELISpot было показано, что наиболее высокие показатели клеточного иммунитета достигнуты в группах, иммунизированных ДНК-вакциной или комбинированным комплексом (рис. 5, б). Так, среднее количество спленоцитов, ответивших на стимуляцию, в обеих группах составило 46 и 54 SFU на 10^6 клеток соответственно ($p > 0,9999$ между группами и $p < 0,01$ по сравнению с двумя другими группами). В группе, получавшей конъю-

гат RBD–PGS, был зарегистрирован низкий ответ на уровне отрицательного контроля (2 SFU).

Обсуждение

Распространение SARS-CoV-2 в масштабах планеты потребовало быстрой разработки вакцины. Глобальная кампания по вакцинации населения предоставила уникальную возможность сравнить различные стратегии и платформы разработанных вакцин. Практически все имеющиеся у исследователей подходы были задействованы в разработке, и в результате на рынок вышли не только классические типы вакцин (инактивированные, субъединичные), но и вакцины нового поколения (мРНК, векторные, ДНК-вакцины).

Критически важным является не только индукция гуморального иммунного ответа и вируснейтрализующих антител, в частности, но и активация вирус-специфического Т-клеточного ответа [29]. В данной работе для создания вакцинной конструк-

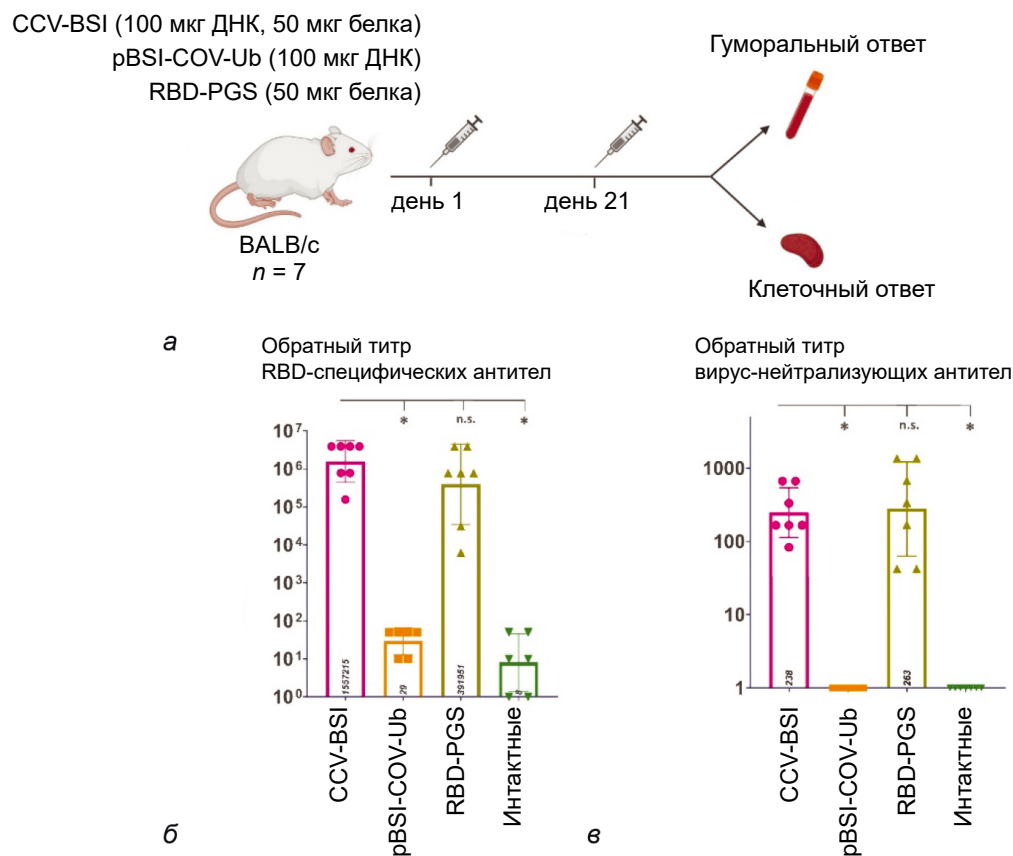


Рис. 4. Гуморальный иммунный ответ у мышей БАЛВ/с, иммунизированных конструкциями CCV-BSI, pBSI-COV-Ub и RBD-PGS. Интактные, неиммунизированные мыши — отрицательный контроль.

а — схематическое изображение эксперимента по исследованию иммуногенности: мышей иммунизировали дважды с интервалом 3 нед, через 2 нед после 2-й иммунизации у мышей забирали образцы для анализа.

б — титры специфических IgG к RBD SARS-CoV-2, определённые в ИФА.

в — титры вируснейтрализующих антител, определённые с использованием штамма SARS-CoV-2 nCoV/Victoria/1/2020.

Данные фрагментов **б** и **в** представлены как геометрические средние обратных титров со стандартным геометрическим отклонением, индивидуальные значения отмечены точками. Значимость различий между группами рассчитывали с использованием непараметрического метода Манна-Уитни (* $p < 0,01$, ** $p < 0,05$, n.s. — статистическая значимость отсутствует).

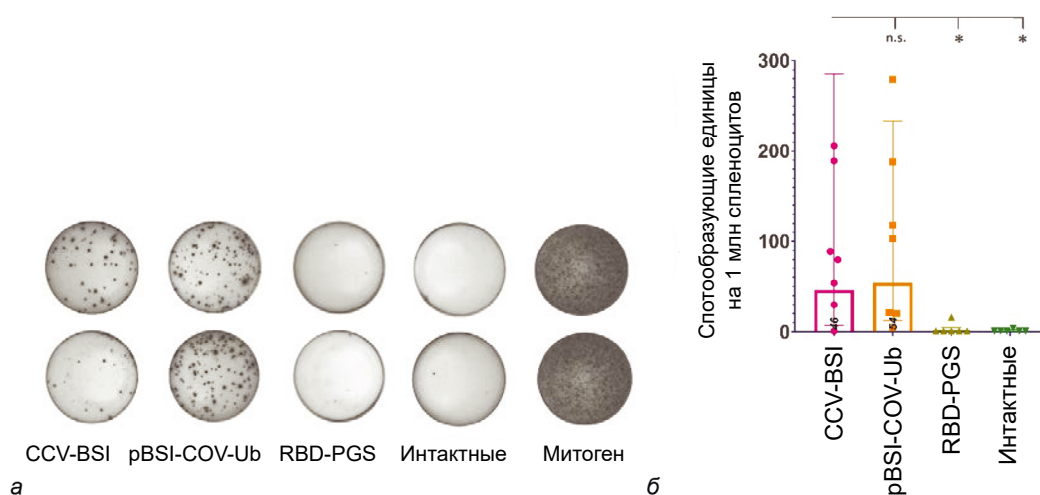


Рис. 5. Клеточный иммунный ответ у мышей БАЛВ/с.

а — изображения репрезентативных лунок в ELISpot.

б — количество спленоцитов, высвобождающих интерферон- γ в ответ на специфическую стимуляцию пептидами из белка RBD и искусственного иммуногена BSI-COV-Ub, подсчитанное с помощью ELISpot. Данные представлены как геометрические средние со стандартным геометрическим отклонением, индивидуальные значения отмечены точками. Значимость различий между группами рассчитывали с использованием непараметрического метода Манна-Уитни (* $p < 0,01$, ** $p < 0,05$, n.s. — статистическая значимость отсутствует).

ции мы объединили две платформы: ДНК-вакцину и рекомбинантный белок. Полученная смесь представляет собой ДНК, окружённую положительно заряженными молекулами PGS, конъюгированного с белком RBD. В качестве антигена выбрали RBD, потому что эта область белка S является доминирующей мишенью для нейтрализующего ответа при инфекции COVID-19.

Ранее мы разработали полиэпитопный искусственный иммуноген, содержащий CTL- и Th-эпитопы из белков S, N, M и E вируса SARS-CoV-2 (рис. 1), и получили ДНК-вакцину pBSI-COV-Ub, кодирующую данный иммуноген (рис. 2) [26]. Фрагменты, выбранные для включения в итоговую конструкцию, содержат эпитопы, рестриктурируемые широким спектром МНС I и II классов человека и мыши, подтвердившие иммунодоминантность в исследовании SARS-CoV-2-специфичного клеточного иммунитета и являющиеся консервативными для разных вариантов вируса [30–32]. После объединения фрагментов в одну последовательность к её N-концу добавили убиквитин. Присоединение убиквитина к белку способствует нацеливанию его на протеасому, что приводит к эффективному процессингу, высвобождению пептидов-эпитопов, которые презентуются МНС I класса на поверхности антигенпрезентирующей клетки и способствуют активации цитотоксических Т-лимфоцитов [33], а также в результате кросс-презентации активируют Т-хелперы.

Используемый в работе конъюгат PGS ранее был использован нами для доставки кандидатных ДНК-вакцин против ВИЧ-1, Эбола и COVID-19 [27, 34, 35]. В исследованиях данных конструкций были доказаны их безопасность и эффективное усиление иммуногенности ДНК-вакцин за счёт использования PGS. PGS защищает ДНК от воздействия нуклеаз, а также способствует пролонгированному высвобождению иммуногена и оказывает иммуномодулирующее воздействие [15, 16]. Компоненты PGS биоразлагаемы и позволяют лиофилизировать препарат вакцины. Конъюгат RBD–PGS обладает положительным зарядом и при добавлении ДНК начинает взаимодействовать с её отрицательно заряженными остатками фосфорной кислоты, образуя комплекс (рис. 3, а). Формирование комплексов было подтверждено снижением подвижности ДНК в агарозном геле (рис. 3, б).

Исследование гуморального иммунного ответа у мышей линии BALB/c на двукратное внутримышечное введение комплекса CCV–BSI показало, что комбинированная конструкция наравне с белком RBD, конъюгированным с PGS, индуцирует наработку высоких титров специфических антител, обладающих нейтрализующей активностью против штамма nCoV/Victoria/1/2020 вируса SARS-CoV-2 на культуре клеток *in vitro* (рис. 4, а, б). Рекомби-

нантный белок RBD без адъюванта обладает менее выраженной иммуногенностью по сравнению с конъюгатом [36]. Более высокий RBD-специфический ответ в группе, иммунизированной CCV–BSI, по сравнению с группой, иммунизированной RBD–PGS (средний титр 1 : 1,5 млн против 1 : 0,3 млн), может говорить о вкладе мультимеризации антигена, возникающем из-за взаимодействия ДНК с несколькими молекулами конъюгата RBD–PGS, а также о стимуляции специфического Т-хелперного ответа за счёт ДНК-вакцины. Подобный синергический эффект в отношении индукции гуморального иммунного ответа был отмечен большинством исследователей, изучавших совместное введение ДНК- и субъединичной вакцины [18–20, 34].

При оценке клеточного ответа с помощью определения количества спленоцитов, продуцирующих IFN- γ в ответ на стимуляцию вирусными пептидами, методом ELISpot наиболее высокий уровень специфического клеточного иммунитета был обнаружен в группах, иммунизированных препаратами, содержащими ДНК-конструкцию pBSI-COV-Ub. Это говорит о том, что ДНК-вакцина и в свободном состоянии, и в состоянии инкапсуляции способна индуцировать специфический Т-клеточный иммунный ответ против широкого спектра вирусных штаммов, тогда как при иммунизации белком RBD, конъюгированным с PGS, индукции Т-клеточного ответа не происходит (рис. 5). Во многих работах использование совместно с субъединичными вакцинами ДНК-вакцин приводит к индукции Т-клеточного ответа. Причём его развитие незначительно зависит от режима введения, т. е. ДНК-вакцина как в качестве прайм-иммунизации, так и при введении совместно с белком стимулирует Т-клетки на уровне, сопоставимом с введением только ДНК-вакцины [20, 21, 34].

Выводы

Уникальная комбинация ДНК и белка в составе одной вакцинной конструкции позволяет преодолеть ограничения каждого из данных типов вакцин и приводит к индукции обоих звеньев иммунитета. Белковый компонент может быть заменён в соответствии с актуальным вирусным штаммом, а универсальный Т-клеточный иммуноген может обеспечить ответ на широкий спектр циркулирующих вариантов. Данная платформа в дальнейшем может быть использована для разработки вакцин против различных вирусов с высокой изменчивостью.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Pawlowski C., Lenehan P., Puranik A., et al. FDA-authorized mRNA COVID-19 vaccines are effective per real-world evidence synthesized across a multi-state health system. *Med.* 2021;2(8):979–92.e8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.medj.2021.06.007>

2. Khobragade A., Bhate S., Ramaiah V., et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of the DNA SARS-CoV-2 vaccine (ZyCoV-D): the interim efficacy results of a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled study in India. *Lancet*. 2022;399(10332):1313–21. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)00151-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00151-9)
3. Logunov D.Y., Dolzhenkova I.V., Shcheblyakov D.V., et al. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet*. 2021;397(10275):671–81. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00234-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00234-8)
4. Ramasamy M.N., Minassian A.M., Ewer K.J., et al. Safety and immunogenicity of ChAdOx1 nCoV-19 vaccine administered in a prime-boost regimen in young and old adults (COV002): a single-blind, randomised, controlled, phase 2/3 trial. *Lancet*. 2021;396(10267):1979–93. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32466-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32466-1)
5. Ng O.W., Chia A., Tan A.T., et al. Memory T cell responses targeting the SARS coronavirus persist up to 11 years post-infection. *Vaccine*. 2016;34(17):2008–14. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.02.063>
6. Alhabbab R.Y., Algaissi A., Mahmoud A.B., et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus infection elicits long-lasting specific antibody, T and B cell immune responses in recovered individuals. *Clin. Infect. Dis*. 2023;76(3):e308–18. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciac456>
7. Zhang Y., Ndzouboukou J.B., Lin X., et al. SARS-CoV-2 evolves to reduce but not abolish neutralizing action. *J. Med. Virol*. 2023;95(1):e28207. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.28207>
8. Le Bert N., Tan A.T., Kunasegaran K., et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature*. 2020;584(7821):457–62. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2550-z>
9. Arya R., Tripathi P., Nayak K., et al. Insights into the evolution of mutations in SARS-CoV-2 non-spike proteins. *Microb. Pathog*. 2023;185:106460. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106460>
10. Srinivasan S., Cui H., Gao Z., et al. Structural genomics of SARS-CoV-2 indicates evolutionary conserved functional regions of viral proteins. *Viruses*. 2020;12(4):360. DOI: <https://doi.org/10.3390/v12040360>
11. Choi S.J., Kim D.U., Noh J.Y., et al. T cell epitopes in SARS-CoV-2 proteins are substantially conserved in the Omicron variant. *Cell. Mol. Immunol*. 2022;19(3):447–8. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41423-022-00838-5>
12. Cromer D., Steain M., Reynaldi A., et al. Neutralising antibody titres as predictors of protection against SARS-CoV-2 variants and the impact of boosting: a meta-analysis. *Lancet Microbe*. 2022;3(1):e52–61. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00267-6](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00267-6)
13. Chavda V.P., Ghali E.N.H.K., Balar P.C., et al. Protein subunit vaccines: Promising frontiers against COVID-19. *J. Control. Release*. 2024;366:761–82. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2024.01.017>
14. Mekonnen D., Mengist H.M., Jin T. SARS-CoV-2 subunit vaccine adjuvants and their signaling pathways. *Expert. Rev. Vaccines*. 2022;21(1):69–81. DOI: <https://doi.org/10.1080/14760584.2021.1991794>
15. Lin H., Han R., Wu W. Glucans and applications in drug delivery. *Carbohydr. Polym*. 2024;332:121904. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.121904>
16. Huang S., Huang G. The dextran as vehicles for gene and drug delivery. *Future Med. Chem*. 2019;11(13):1659–67. DOI: <https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0586>
17. An Y., Zhao G., Duan H., et al. Robust and protective immune responses induced by heterologous prime-boost vaccination with DNA-protein dimeric RBD vaccines for COVID-19. *J. Med. Virol*. 2023;95(7):e28948. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.28948>
18. Jalah R., Kulkarni V., Patel V., et al. DNA and protein co-immunization improves the magnitude and longevity of humoral immune responses in macaques. *PLoS One*. 2014;9(3):e91550. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091550>
19. Felber B.K., Lu Z., Hu X., et al. Co-immunization of DNA and protein in the same anatomical sites induces superior protective immune responses against SHIV challenge. *Cell Rep*. 2020;31(6):107624. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107624>
20. Li Y., Bi Y., Xiao H., et al. A novel DNA and protein combination COVID-19 vaccine formulation provides full protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Emerg. Microbes Infect*. 2021;10(1):342–55. DOI: <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1887767>
21. Liao H.C., Huang M.S., Chiu F.F., et al. Co-delivery of a trimeric spike DNA and protein vaccine with aluminum hydroxide enhanced Th1-dominant humoral and cellular immunity against SARS-CoV-2. *J. Med. Virol*. 2023;95(8):e29040. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.29040>
22. He Q., Mao Q., An C., et al. Heterologous prime-boost: breaking the protective immune response bottleneck of COVID-19 vaccine candidates. *Emerg. Microbes Infect*. 2021;10(1):629–37. DOI: <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1902245>
23. Peng D., Zhao T., Hong W., et al. Heterologous vaccination with subunit protein vaccine induces a superior neutralizing capacity against BA.4/5-included SARS-CoV-2 variants than homologous vaccination of mRNA vaccine. *MedComm (2020)*. 2023;4(2):e238. DOI: <https://doi.org/10.1002/mco2.238>
24. Kim E., Khan M.S., Ferrari A., et al. SARS-CoV-2 S1 subunit booster vaccination elicits robust humoral immune responses in aged mice. *Microbiol. Spectr*. 2023;11(3):e0436322. DOI: <https://doi.org/10.1128/spectrum.04363-22>
25. Park H.J., Bang Y.J., Kwon S.P., et al. Analyzing immune responses to varied mRNA and protein vaccine sequences. *NPJ Vaccines*. 2023;8(1):84. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41541-023-00684-0>
26. Borgoyakova M.B., Karpenko L.I., Rudometov A.P., et al. Artificial COVID-19 T-cell immunogen. *Bull. Exp. Biol. Med*. 2023;175(6):804–9. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10517-023-05951-7>
27. Borgoyakova M.B., Karpenko L.I., Rudometov A.P., et al. Self-assembled particles combining SARS-CoV-2 RBD protein and RBD DNA vaccine induce synergistic enhancement of the humoral response in mice. *Int. J. Mol. Sci*. 2022;23(4):2188. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23042188>
28. Singh A. Eliciting B cell immunity against infectious diseases using nanovaccines. *Nat. Nanotechnol*. 2021;16(1):16–24. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41565-020-00790-3>
29. Toor S.M., Saleh R., Sasidharan Nair V., et al. T-cell responses and therapies against SARS-CoV-2 infection. *Immunology*. 2021;162(1):30–43. DOI: <https://doi.org/10.1111/imm.13262>
30. Safavi A., Kefayat A., Mahdevar E., et al. Exploring the out of sight antigens of SARS-CoV-2 to design a candidate multi-epitope vaccine by utilizing immunoinformatics approaches. *Vaccine*. 2020;38(48):7612–28. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.10.016>
31. Mahajan S., Kode V., Bhojak K., et al. Immunodominant T-cell epitopes from the SARS-CoV-2 spike antigen reveal robust pre-existing T-cell immunity in unexposed individuals. *Sci. Rep*. 2021;11(1):13164. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92521-4>
32. Bhattacharya M., Sharma A.R., Ghosh P., et al. A next-generation vaccine candidate using alternative epitopes to protect against wuhan and all significant mutant variants of SARS-CoV-2: An immunoinformatics approach. *Aging Dis*. 2021;12(8):2173–95. DOI: <https://doi.org/10.14336/AD.2021.0518>

33. de Oliveira L.M., Morale M.G., Chaves A.A., et al. Expression, polyubiquitination, and therapeutic potential of recombinant E6E7 from HPV16 antigens fused to ubiquitin. *Mol. Biotechnol.* 2017;59(1):46–56.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s12033-016-9990-6>
34. Bazhan S.I., Karpenko L.I., Lebedev L.R., et al. A synergistic effect of a combined bivalent DNA-protein anti-HIV-1 vaccine containing multiple T- and B-cell epitopes of HIV-1 proteins. *Mol. Immunol.* 2008;45(3):661–9.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.07.016>

Информация об авторах

Боргоякова Мария Борисовна[✉] — канд. биол. наук, с. н. с. отд. биоинженерии ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, borgoyakova_mb@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0768-1561>

Рудометов Андрей Павлович — канд. биол. наук, в. н. с., и. о. зав. отд. биоинженерии ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, rudometov_ap@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2808-4309>

Старостина Екатерина Владимировна — канд. биол. наук, с. н. с. отд. биоинженерии ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, starostina_ev@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1733-9524>

Яковлев Владимир Андреевич — м. н. с. отд. биоинженерии ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, yakovlev_va@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0009-0009-4563-2099>

Тигеева Елена Витальевна — м. н. с. отд. биоинженерии ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, tigeeva_ev@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0009-0001-5203-2130>

Зайковская Анна Владимировна — канд. биол. наук, с. н. с. отд. «Коллекция микроорганизмов» ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, zaykovskaya_av@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0450-5212>

Волосникова Екатерина Александровна — канд. биол. наук, в. н. с., зав. лаб. получения и анализа биосубстанций ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, volosnikova_av@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5028-5647>

Меркулева Юлия Александровна — канд. биол. наук, с. н. с. отд. биофизики и экологических исследований ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, merkuleva_iua@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6974-0686>

Исаева Анастасия Александровна — канд. хим. наук, н. с. отд. биофизики и экологических исследований ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, isaeva_aa@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4085-2887>

Несмеянова Валентина Сергеевна — м. н. с. отд. биофизики и экологических исследований ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, nesmeyanova_vs@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1091-3586>

Шаншин Даниил Васильевич — канд. биол. наук, м. н. с. отд. биофизики и экологических исследований ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, shanshin_dv@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9985-1582>

Зайцев Борис Николаевич — канд. физ.-мат. наук, с. н. с. отд. микробиологических исследований ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, zaitsev@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6359-465X>

Кисаков Денис Николаевич — м. н. с. отд. биоинженерии ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, kisakov_dn@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4889-6865>

Кисакова Любовь Александровна — м. н. с. отд. биоинженерии ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, orlova_la@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7214-1855>

Щербakov Дмитрий Николаевич — канд. биол. наук, в. н. с. отд. биофизики и экологических исследований ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, scherbakov_dn@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8023-4453>

Карпенко Лариса Ивановна — д-р биол. наук, в. н. с., зав. лаб. рекомбинантных вакцин отдела биоинженерии ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, ikarpenko1@ya.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4365-8809>

35. Karpenko L.I., Apartsin E.K., Dudko S.G., et al. Cationic polymers for the delivery of the Ebola DNA vaccine encoding artificial T-cell immunogen. *Vaccines (Basel)*. 2020;8(4):718.
DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines8040718>

36. Volosnikova E.A., Merkuleva I.A., Esina T.I., et al. SARS-CoV-2 RBD conjugated to polyglucin, spermidine, and dsRNA elicits a strong immune response in mice. *Vaccines (Basel)*. 2023;11(4):808.
DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines11040808>

Information about the authors

Mariya B. Borgoyakova[✉] — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Department of bioengineering, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Russia, borgoyakova_mb@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0768-1561>

Andrey P. Rudometov — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Acting Head, Department of bioengineering, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Russia, rudometov_ap@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2808-4309>

Ekaterina V. Starostina — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Department of bioengineering, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Russia, starostina_ev@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1733-9524>

Vladimir A. Yakovlev — junior researcher, Department of bioengineering, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Russia, yakovlev_va@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0009-0009-4563-2099>

Elena V. Tigeeva — junior researcher, Department of bioengineering, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Russia, tigeeva_ev@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0009-0001-5203-2130>

Anna V. Zaykovskaya — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Department «Collection of microorganisms», State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Russia, zaykovskaya_av@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0450-5212>

Ekaterina A. Volosnikova — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Head, Laboratory of the production and analysis of biosubstances, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Russia, volosnikova_av@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5028-5647>

Iuliia A. Merkuleva — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Department of biophysics and environmental research, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Russia, merkuleva_iua@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6974-0686>

Anastasya A. Isaeva — Cand. Sci. (Chem.), researcher, Department of biophysics and environmental research, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Russia, isaeva_aa@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4085-2887>

Valentina S. Nesmeyanova — junior researcher, Department of biophysics and environmental research, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Russia, nesmeyanova_vs@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1091-3586>

Daniil V. Shanshin — Cand. Sci. (Biol.), junior researcher, Department of biophysics and environmental research, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Russia, shanshin_dv@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9985-1582>

Boris N. Zaitsev — Cand. Sci. (Phys.-Math.), senior researcher, Department of microscopic research, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Russia, zaitsev@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6359-465X>

Denis N. Kisakov — junior researcher, Department of bioengineering, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Russia, kisakov_dn@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4889-6865>

Lyubov A. Kisakova — junior researcher, Department of bioengineering, State Research Center of Virology and Biotechnology

Ильичёв Александр Алексеевич — д-р биол. наук, г. н. с. отд. биотехнологии ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, ilyichev@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5356-0843>

Участие авторов: *Боргоякова М.Б.* — дизайн исследования, сбор, анализ и интерпретация данных, написание, оформление и редактирование рукописи; *Рудомётов А.П.* — дизайн исследования, интерпретация данных, редактирование рукописи; *Старостина Е.В., Яковлев В.А., Тигеева Е.В., Зайковская А.В., Волосникова Е.А., Меркульева Ю.А., Исаева А.А., Несмеянова В.С., Шаньшин Д.В., Зайцев Б.Н., Кисаков Д.Н., Кисакова Л.А.* — сбор и анализ данных; *Щербakov Д.Н.* — интерпретация данных; *Карпенко Л.И.* — идея, дизайн и концептуализация исследования, интерпретация данных, 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 27.07.2025;
принята к публикации 05.10.2025;
опубликована 31.10.2025

«Vector», Koltsovo, Russia, orlova_la@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7214-1855>

Dmitry N. Shcherbakov — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Department of biophysics and environmental research, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Russia, scherbakov_dn@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8023-4453>

Larisa I. Karpenko — Dr. Sci. (Biol.), leading researcher, Head, Laboratory of recombinant vaccines, Department of bioengineering, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Russia, lkarpenko1@ya.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4365-8809>

Alexander A. Ilyichev — Dr. Sci. (Biol.), chief researcher, Department of bioengineering, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Russia, ilyichev@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5356-0843>

Authors' contribution: *Borgoyakova M.B.* — study design; data collection, analysis, and interpretation; manuscript writing, formatting, and editing; *Rudometov A.P.* — study design; data interpretation, and manuscript editing; *Starostina E.V., Yakovlev V.A., Tigeeva E.V., Zaykovskaya A.V., Volosnikova E.A., Merkuleva I.A., Isaeva A.A., Nesmeyanova V.S., Shanshin D.V., Zaitsev B.N., Kisakov D.N., Kiskova L.A.* — data collection and analysis; *Shcherbakov D.N.* — data interpretation; *Karpenko L.I.* — idea, design, and conceptualization of the study; data interpretation; manuscript editing; *Ilyichev A.A.* — study conceptualization; data interpretation, and manuscript 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 27.07.2025;
accepted for publication 05.10.2025;
published 31.10.2025



Критерии оценки качества геномов *Pseudomonas aeruginosa*

Ковалевич А.А.[✉], Водопьянов А.С., Писанов Р.В.

Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия

Аннотация

Введение. С развитием технологий секвенирования растёт объём геномных данных, что требует разработки показателей для оценки качества сборок геномов. Современные инструменты (Plantago, SQUAT, QUAST, BUSCO, CheckM2 и др.) являются унифицированными, но при этом не учитывают особенностей организации генома конкретных видов. Особенно остро стоит вопрос импортозамещения биоинформационных инструментов в условиях ограниченного доступа к зарубежным технологиям. Кроме того, отсутствуют специализированные методы оценки качества сборок генома *Pseudomonas aeruginosa*, что ограничивается общими метриками (N50, количество контигов).

Цель работы — разработка алгоритма и критериев на основе комплексного подхода для специфической оценки качества полногеномного секвенирования представителей вида *P. aeruginosa*.

Материалы и методы. Исследование проводили на 108 штаммах *P. aeruginosa*. Авторское программное обеспечение разработано на языках Java и Python.

Результаты. Разработан алгоритм оценки качества полногеномных данных *P. aeruginosa* на основе анализа ключевых генов жизнеобеспечения (*fur*, *algU*, *dinB* и др.), размера генома, GC-состава и показателя N50. Геномы с отсутствием ключевых генов или структурными ошибками классифицируются как плохие или средние, последние не рекомендуются для филогенетического анализа. Алгоритм предлагает простые и понятные параметры оценки качества полногеномных данных.

Заключение. На основе анализа генов жизнеобеспечения, размера генома, GC-состава и показателя N50 нами разработана классификация качества сборок геномов *P. aeruginosa* (хорошее, среднее, низкое). Созданы алгоритм и программа «Genomes Validator» для оперативной оценки.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, полногеномное секвенирование, гены жизнеобеспечения, оценка качества

Источник финансирования. Исследование проведено в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора (2021–2025).

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

Для цитирования: Ковалевич А.А., Водопьянов А.С., Писанов Р.В. Критерии оценки качества геномов *Pseudomonas aeruginosa*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2025;102(5):583–591.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-704>

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

Criteria for assessment of the quality of *Pseudomonas aeruginosa* genome sequences

Alexey A. Kovalevich[✉], Alexey S. Vodopianov, Ruslan V. Pisanov

Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute, Rostov-on-Don, Russia

Abstract

Introduction. With the development of sequencing technologies, the volume of genomic data is increasing, which necessitates the development of metrics for assessing the quality of genome assembly. Despite the unified nature of modern instruments (Plantago, SQUAT, QUAST, BUSCO, CheckM2, etc.), they do not take into account the specific genome organization of particular species. The issue of import substitution of bioinformatics tools is particularly acute given limited access to foreign technologies. Furthermore, there are no specialized methods for assessing the quality of *Pseudomonas aeruginosa* genome assemblies, which is limited to general metrics (N50, number of contigs).

The aim of the study is to develop an algorithm and criteria based on a comprehensive approach for the specific assessment of the quality of whole-genome sequencing of *P. aeruginosa*.

Materials and methods. The study was conducted on 108 strains of *P. aeruginosa*. The proprietary software is developed in Java and Python languages.

Results. An algorithm for assessing the quality of *P. aeruginosa* whole-genome data has been developed based on the analysis of key housekeeping genes (*fur*, *algU*, *dinB*, etc.), genome size, GC content, and the N50 value. Genomes lacking key genes or with structural errors are classified as poor or medium, with the latter not recommended for phylogenetic analysis. The algorithm offers simple and clear parameters for assessing the quality of whole-genome data.

Conclusion. Based on the analysis of essential genes, genome size, GC content, and the N50 index, we have developed a classification of the quality of *P. aeruginosa* genome assemblies (good, medium, low). An algorithm and the Genomes Validator program have been created for rapid assessment.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, whole-genome sequencing, housekeeping genes, quality assessment

Funding source. The study was conducted as part of the Rospotrebnadzor industry research program (2021–2025).

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

For citation: Kovalevich A.A., Vodopianov A.S., Pisanov R.V. Criteria for assessment of the quality of *Pseudomonas aeruginosa* genome sequences. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(5):583–591.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-704>

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

Введение

С развитием технологий высокопроизводительного секвенирования и снижением их стоимости объёмы производимых данных о геномах растут в геометрической прогрессии. Проекты, использующие большие массивы данных полногеномного секвенирования (whole-genome sequencing, WGS), имеют множество преимуществ: повышается статистическая мощность, появляется возможность проверять различные гипотезы о микро- и макроэволюции геномов.

Постоянное совершенствование технологий секвенирования и биоинформатического анализа повысило значимость WGS в биологии, медицине, фармацевтике и сельском хозяйстве, стимулируя проведение сравнительных геномных исследований. Однако рост числа проектов и лабораторий, занимающихся секвенированием, привёл к увеличению количества сборок геномов, не всегда пригодных для анализа. Это подчеркнуло необходимость оценки качества данных полногеномных сборок для исследователей, использующих эти данные. В связи с этим возникла потребность в разработке стандартных показателей для сравнения качества сборок и аннотаций геномов, а также для оценки эффективности различных методов их получения.

Недавние исследования оценки качества сборки геномов были сосредоточены либо на контроле качества перед сборкой, либо на оценке сборки с точки зрения непрерывности и правильности. Однако оценка корректности зависит от эталона и неприменима для проектов сборки *de novo*. Следовательно, стоит изучить методы, позволяющие получать отчёты об оценке качества как после сборки,

так и до неё, для проверки качества/корректности сборки *de novo* и входных данных [1].

Для сборок генома такие показатели, как количество контигов, количество скафолдов, N50 (максимальная длина контига, при котором суммарная длина всех контигов, не короче этой величины, составляет не менее 50% от общей длины всей контигов в сборке), дают только краткое представление о качестве генома, не всегда отражая его аналитическую пригодность.

В свою очередь на сегодняшний день существует достаточное количество ресурсов и инструментов для постаналитического этапа работы, а также оценки качества геномов: Picard¹, SQUAT [1], Plantagora [2], QUAST [3], CheckM1 [4], CheckM2 [5], GenomeQC [6], BUSCO [7]. Однако они являются унифицированными и представляют собой алгоритмы разной направленности, иногда удобные для анализа только эукариотических организмов, при этом не учитывающие особенностей организации генома конкретного вида. Одним из наиболее универсальных и широко применяемых инструментов, использующих гены для оценки данных WGS, является BUSCO. В отличие от упомянутых выше решений, BUSCO фокусируется на анализе геномов, используя эволюционно консервативные гены-ортологи, которые считаются «универсальными» для некоторых таксономических групп (бактерий, грибов, растений или животных). Однако BUSCO не даёт ответа о качестве анализируемого генома, выдавая только процент обнаруженных/необнаруженных генов-ортологов, и заключительный ответ должен сформировать сам специалист. Вместе с тем гены-ортологи могут утрачиваться без потери

¹ Picard Tools. GitHub repository. Broad Institute; 2019.
URL: <http://broadinstitute.github.io/picard>

жизнеспособности бактерий, в отличие от генов домашнего хозяйства, что может привести к ошибке оценки качества генома.

В настоящее время WGS возбудителей инфекционных заболеваний широко используется для их изучения, определения их происхождения и распространения. Для оценки качества такого большого количества данных необходимы отечественные программные инструменты. Последнее особенно важно ввиду того, что импортозамещение становится одной из стратегических задач в условиях, когда доступ к зарубежным технологиям, а также иностранным банкам данных затруднён [8].

Критериев оценки данных WGS для представителей *Pseudomonas aeruginosa* на сегодняшний день нет. Существуют программные сервисы, которые осуществляют оценку в общих (неспецифических) критериях (N50, количество контигов и т. п.) и не учитывают особенности конкретного микроорганизма.

Цель исследования — создание алгоритма и критериев для оценки качества данных WGS представителей вида *P. aeruginosa*, а также создание отечественного программного обеспечения, способного оценить качество данных WGS.

Материалы и методы

В работе использовали 108 геномов штаммов *P. aeruginosa*: 24 штамма получены из Коллекции патогенных микроорганизмов Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора (выделены в Ростове-на-Дону, Хабаровске, Мариуполе в 2022–2024 гг.), 84 штамма получены из международной базы NCBI. WGS проведено в ходе реализации федерального проекта социально-экономического развития Российской Федерации до 2030 г. «Санитарный щит страны — безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)». Секвенирование проводили на платформе «MiSeq» («Illumina») с использованием набора для секвенирования «MiSeq Reagent Kit v2 (500-cycles)» («Illumina»). Этот метод позволяет получать прочтения длиной 2×251 нуклеотидов, покрытие геномов составляло 8–20.

Оценку первичных данных секвенирования проводили с использованием программы FastQC. Собранные данные WGS анализировали с помощью программы QUAST² [4]. Для тримминга и коррекции ридов использовали алгоритмы Trimmomatic [9] и Lighter [10]. Сборку геномов, представленных в виде ридов, проводили с использованием программы Spades [11]. Все геномы прошли первичную оценку с помощью программы Kraken 2, позволяющей определять принадлежность фрагментов ДНК к раз-

личным прокариотическим видам [12]. В качестве референс-генома были использованы данные WGS штамма PAO1 из международной базы NCBI [13].

Авторское программное обеспечение разрабатывали на языках программирования Java и Python. Алгоритм поиска последовательностей генов в сборке осуществляли с помощью локального выравнивания Смита–Ватермана с минимальным порогом сходства 80%.

Рассчитывали доверительный интервал (формат представления данных — $M \pm SD$), различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Известно, что в составе генома возбудителя синегнойной инфекции имеется ряд генов, критически важных для его жизнедеятельности. Такие гены получили название «гены жизнеобеспечения» (housekeeping genes). Очевидно, что если в данных WGS отсутствует какой-либо из этих генов, то это является ошибкой секвенирования и/или сборки генома. Именно данная особенность и была положена в основу предлагаемого нами алгоритма — в сиквенсе хорошего качества должны обнаруживаться все гены жизнеобеспечения. Разумеется, при этом большое значение имеет подбор генов, по которым будет проводиться контроль качества.

Один из критериев для оценки качества геномов, который был продуман нами для алгоритма, — это выбор генов, которые будут отобраны по следующим критериям:

- нуклеотидные последовательности в пределах 1000 пар оснований (п. о.);
- ген должен быть однокопийным;
- ген должен непосредственно участвовать в физиологической деятельности микроорганизма, выполняя основные функции для жизнедеятельности;
- ген должен присутствовать у всех штаммов *P. aeruginosa*.

Для оперативной видовой идентификации *P. aeruginosa* был выбран ген *oprI*. Основной задачей является оценка качества данных секвенирования не только на основе идентификации генов жизнеобеспечения, но и на транскрипции их последовательностей. Учитывая, что данные гены являются критически важными для существования микробной клетки, их отсутствие в геноме или критические ошибки транскрипции (стоп-кодона) расцениваются как ошибка секвенирования.

Гены жизнеобеспечения, по которым осуществлялась валидация выбранных полногеномных последовательностей *P. aeruginosa*: *fur*, *algU*, *dinB*, *dnaQ*, *holA*, *holB*, *PA0472*, *fpvI*, *tonB1*, *cntL*, *sigX*, *capB*, *cspD*, *groES*, *rpoH*. Выбранные гены являются обязательными для функционирования и выживания в окружающей среде и макроорганизме. В каче-

² Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data; 2010. URL: <https://bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

стве критериев оценки полногеномных последовательностей были выбраны следующие параметры: GC-состав геномов *P. aeruginosa*, размер полногеномной последовательности *P. aeruginosa*, значение скафолда N50.

После проведения исследования и выбора критериев оценки качества геномов разработано программное обеспечение «Genomes Validator», которое для удобства предполагает работу в «пакетном режиме», анализирует неограниченное количество геномов, результаты выдаются в табличном виде. При этом для каждого генома указываются название исходного файла, вид, качество (bad, average, good), длина, показатель N50, показатель GC-состава, причина невалидности генома (рис. 1).

Разработанная программа «Genomes Validator» является кросс-платформенной, имеет графический интерфейс, не требует установки, позволяет анали-

зировать несколько геномов сразу и доступна для скачивания на сайте <https://github.com/alexeyvod/GenomesValidator>, обладает интуитивно понятным интерфейсом и удобна для пользователей без навыков программирования.

Валидация программы была проведена на выборке из 108 полногеномных последовательностей штаммов *P. aeruginosa*. По итогам валидации были идентифицированы геномы хорошего (63%), среднего (29%), плохого (8%) качества. Из дальнейшего анализа были выведены 37% анализируемых геномов (среднего и плохого качества), что может помочь избежать ошибок при дальнейших расчётах с использованием биоинформатических методов. Средний показатель N50 среди выборки был равен 1 250 527.

Параметры N50, длина генома, GC-состав были идентичными показателям программ, взятых для сравнения: «CheckM2» и «QUAST». Однако эти

File	Species	Quality	Length	N50	GC	Reason
17892_1..NZ_JAJPN010000010	<i>P. aeruginosa</i>	good	6 629 247	509 550	66,4	
178967_1..NZ_JAJPNH010000010	<i>P. aeruginosa</i>	bad	6 524 386	749 341	66,4	exsA not found
17896_7_2..NZ_JAJPKU010000010	<i>P. aeruginosa</i>	bad	6 950 057	1 006 751	66,4	exsA not found
17897..NZ_JAJPNG010000010	<i>P. aeruginosa</i>	good	6 400 979	391 977	66,4	
17898_1..NZ_JAJPNF010000010	<i>P. aeruginosa</i>	good	6 432 087	511 042	66,4	
212_1..NZ_JAJPLU010000100	<i>P. aeruginosa</i>	average	6 260 559	63 774	66,8	sigX: 109/165 AK
212_2..NZ_JAJPLT010000010	<i>P. aeruginosa</i>	good	6 493 778	783 066	66,4	
215_4..NZ_JAJPLS010000010	<i>P. aeruginosa</i>	good	6 582 214	298 991	66,2	
220_2..NZ_JAJPLR010000010	<i>P. aeruginosa</i>	good	6 298 665	487 435	66,4	
224_1..NZ_JAJPLQ010000010	<i>P. aeruginosa</i>	average	6 523 464	322 858	66,2	AlgU: 47/193 AK
225_1..NZ_JAJPLP010000010	<i>P. aeruginosa</i>	average	6 419 808	377 166	66,3	endA: 0/237 AK
99_1..NZ_JAJPMG010000010	<i>P. aeruginosa</i>	good	6 829 566	675 464	66,4	
99_2..NZ_JAJPMF010000010	<i>P. aeruginosa</i>	good	6 426 869	414 815	66,4	
CriePir106..NZ_JAHYBC010000100	<i>P. aeruginosa</i>	good	6 812 483	90 989	66,1	
CriePir111..NZ_JAHYBB010000100	<i>P. aeruginosa</i>	good	6 951 545	78 424	65,7	
CriePir156..NZ_JAHYAV010001000	<i>P. aeruginosa</i>	average	6 689 553	10 010	65,6	dnaQ: 141/246 AK, endA: 0/237 AK, holB: 207/328 AK, tonB1: 215/342 AK
CriePir161..NZ_JAHYAU010000100	<i>P. aeruginosa</i>	average	6 800 283	23 819	65,9	tonB1: 215/342 AK
CriePir166..NZ_JAHYAT010000100	<i>P. aeruginosa</i>	average	6 655 849	25 317	65,7	tonB1: 236/342 AK
CriePir178..NZ_JAHYAP010000100	<i>P. aeruginosa</i>	good	7 041 578	29 410	65,7	
CriePir191..NZ_JAHYAO010000100	<i>P. aeruginosa</i>	average	6 846 650	29 382	65,9	endA: 0/237 AK
CriePir198..NZ_JAHYAN010000100	<i>P. aeruginosa</i>	bad	6 374 609	45 212	66,3	dinB not found
CriePir199..NZ_JAHYAM010000100	<i>P. aeruginosa</i>	good	6 838 465	38 717	66,0	
CriePir201..NZ_JAHYAL010000100	<i>P. aeruginosa</i>	bad	6 634 250	36 597	65,8	sigX not found, exsA not found
P.aerug_8610	<i>P. aeruginosa</i>	good	6 924 285	246 611	65,6	
P.aerug_8612	<i>P. aeruginosa</i>	good	7 189 749	203 787	65,6	
P.aerug_8618	<i>P. aeruginosa</i>	good	7 137 324	160 374	64,9	
P.aerug_8633	<i>P. aeruginosa</i>	good	6 859 103	68 010	65,9	
Ps-agn-2308	<i>P. aeruginosa</i>	good	6 416 707	232 338	66,3	
Ps-agn-2350	<i>P. aeruginosa</i>	good	6 376 962	124 891	66,4	
Ps-agn-2424	<i>P. aeruginosa</i>	bad	8 752 214	9 282	64,2	Bad genome size
Ps-agn-2630	<i>P. aeruginosa</i>	average	6 799 119	16 295	66,3	
Ps-agn-2632	<i>P. aeruginosa</i>	average	6 763 523	19 158	66,3	
Ps-agn-2633	<i>P. aeruginosa</i>	average	6 719 361	13 924	66,3	
Ps-agn-2679	<i>P. aeruginosa</i>	good	6 640 636	32 082	66,3	
Ps-agn-2889	<i>P. aeruginosa</i>	bad	10 021 928	80 678	61,7	GC 61,7/66,0, Bad genome size
Ps-agn-2911	<i>P. aeruginosa</i>	bad	7 220 888	7 168	66,3	rhoH: 4/284 AK
Ps-agn-2935	<i>P. aeruginosa</i>	good	6 521 883	135 034	66,3	
Ps-agn-3458	<i>P. aeruginosa</i>	good	6 564 683	80 015	66,2	
Ps-agn-3835	<i>P. aeruginosa</i>	good	6 401 529	75 569	66,4	
Ps-agn-3842	<i>P. aeruginosa</i>	good	6 560 656	205 289	66,2	
SCPM-O-B-9017_(B-75_14)..NZ_J	<i>P. aeruginosa</i>	average	6 984 402	109 723	66,0	endA: 0/237 AK, cspD : 55/90 AK

Рис. 1. Демонстрация работы программы «Genomes Validator», результат анализа геномов приводится в табличном формате.

программы не предоставляют параметры оценки качества геномов.

При оценке качества бактериальных геномов с использованием программного обеспечения «CheckM2» нами установлено, что геномы со значением Completeness, равным 100, демонстрировали значительную вариабельность показателя контаминации (Contamination). Вместе с тем применение инструмента «Genomes Validator» позволило дополнительно оценить размер полногеномной последовательности, что может быть более информативным для практического анализа данных WGS (рис. 2). Данный параметр позволяет предварительно судить о наличии внехромосомных элементов в геноме исследуемого штамма. Следует учитывать, что контаминация ДНК посторонней микрофлорой, как правило, отражается на общем GC-составе и существенном изменении размера генома, тогда как присутствие плазмид или других мобильных генетических элементов не вызывает существенных изменений этого параметра.

На основании проведённого статистического анализа параметров Completeness и Contamination (таблица) выявлено, что значения Contamination в диапазоне от 2 до 8 могут свидетельствовать о возможной низкой достоверности полученных данных WGS. Однако такие результаты также могут быть обусловлены специфическими особенностями генома клинического изолята. Так, геном штамма Ps-agn-2889, проанализированный в программе «CheckM2», имеет показатель Completeness = 100 при Contamination = –35,65, однако из полученных данных причина контаминации не ясна. При анализе в программе «Genomes Validator» увеличенный в 1,5 раза размер генома и GC-состав указывают на явную контаминацию посторонней бактериальной ДНК. Геном клинического штамма 44269 проанализированный в программе «CheckM2», имеет по-

казатель Completeness = 100 при Contamination = –12,04, что ставит под сомнение его качество. Тем не менее при использовании программы «Genomes Validator» размер генома и GC-состав указывают на явное присутствие внехромосомных элементов, которые влияют на показатель Contamination, а не на контаминацию чужеродной ДНК, что следует из исследования авторов штамма [16].

Обсуждение

В качестве гена, определяющего видовую принадлежность, был выбран *oprI* по ряду причин: нуклеотидная последовательность 253 п. о., что даёт возможность определить видовую принадлежность даже в случае очень плохого качества данных WGS; белок OprI выполняет важную роль в связывании с пептидогликаном, участвует в иммунологических реакциях и чувствительности к антимикробным пептидам [15–17]. Этот ген был выбран, поскольку одно из метаисследований показало, что он успешно применяется для идентификации вида *P. aeruginosa* с высокой точностью [18].

Гены жизнеобеспечения, по которым будет осуществляться валидация выбранных полногеномных последовательностей *P. aeruginosa* (*fur*, *algU*, *dinB*, *dnaQ*, *holA*, *holB*, *PA0472*, *fpvI*, *tonB1*, *cntL*, *sigX*, *capB*, *cspD*, *groES*, *rpoH*), были выбраны в результате анализа данных литературных на основании их функциональной значимости.

Ген *fur* является основным регулятором поглощения железа у прокариотических организмов, необходим *P. aeruginosa* для реализации патогенеза, а также выживания в условиях дефицита железа [19].

Сигма-фактор *algU* — ключевой регулятор реакции на стресс, который контролирует экспрессию более 300 генов, играет важнейшую роль в синтезе факторов вирулентности и патогенезе посредством кворум-сенсинга, усиливает выработку альгината, повышая экспрессию оперона *algD* [20].

В SOS-опосредованный мутагенез вовлекаются продукты гена *dinB*, которые осуществляют транслезионный синтез ДНК (через повреждение), демонстрируя низкую точность, но при этом помогая оперативно реплицировать ДНК в ответ на различные агенты, её повреждающие. Однако происходит накопление мутаций, которые в свою очередь помогают приобретать адаптивные механизмы в ответ на антибактериальные препараты [21].

Сравнение показателей качества программ «CheckM2» и «Genomes Validator»

«Genomes validator»	«CheckM2»	
	completeness	contamination
Good	99,99 ± 0,001	0,98 ± 0,203
Average	83,89 ± 1,865	2,23 ± 0,222
Bad	81,01 ± 6,667	8,72 ± 3,708

Примечание. Указаны данные при $p < 0,05$.

Strain	CheckM2				Genomes Validator					
	Completeness	Contamination	Contig_N50	GC_Content	Species	Quality	Length	N50	GC	Reason
294_2..JAJPNW010001000	100	1.06	191 133	0.64	<i>P. aeruginosa</i>	good	7672154	191133	63.8	
3392MAR21..JBKEPE01000003	100	0.07	252 389	0.66	<i>P. aeruginosa</i>	good	6585805	252389	66.3	
44269..JAGGDG010000986	100	12.04	225 018	0.66	<i>P. aeruginosa</i>	good	7829472	225018	66.3	
99_1..JAJPMG010000010	100	4.37	675 464	0.66	<i>P. aeruginosa</i>	good	6829566	675464	66.4	
Ps-agn-2889	100	35.65	80 678	0.62	<i>P. aeruginosa</i>	bad	10021928	80678	61.7	GC 61,7/66,0, Bad genome size

Рис. 2. Фрагмент таблицы сравнительной характеристики работы программ «CheckM2» и «Genomes validator».

ДНК-полимераза III ϵ -субъединица, кодируемая геном *dnaQ*, очень важна и обеспечивает 3'-5'-экзонуклеазную активность, корректируя несоответствия, встречающиеся при репарации ДНК, что позволяет удалять и исправлять несоответствующие пары оснований. Мутации гена *dnaQ* могут приводить к нарушению этих процессов, при этом частота мутаций в геноме увеличивается более чем в 1000 раз [22]. Холофермент ДНК-полимераза III состоит из δ -, δ' -субъединиц, которые кодируются генами *holA*, *holB*, образуя сложный комплекс с ϵ -субъединицей гена *dnaQ* и совместно участвуя в репарации ДНК [23]. Ген *PA0472* кодирует σ -фактор РНК-полимеразы. Тяжело судить, какую роль в геноме *P. aeruginosa* выполняет конкретный σ -фактор, но известно, что σ -факторы РНК-полимераз выполняют огромный спектр жизненно необходимых функций: распознавание промотора, расплетение двухцепочечной ДНК, связывание с РНК-полимеразой, контроль транскрипции. Они участвуют также в транскрипции специфических регулонов, связанных с ответом на изменения окружающей среды, включены в транспорт железа [24].

Одним из σ -факторов РНК-полимеразы, участвующей в процессах ассимиляции железа, является белок FpvI, кодируемый геном *fpvI*, который вовлечён в процессы регуляции поглощения высокоаффинного сидерофора — пиовердина, являющегося важным фактором вирулентности, т. к. способен вытеснять железо из комплекса железо-трансферрин [25].

P. aeruginosa имеет в своём геноме 3 гена, кодирующие белки TonB (*tonB1*, *tonB2* и *tonB3*), и только белок TonB1, кодируемый *tonB1*, взаимодействует с TonB-зависимыми переносчиками, задействованными в поглощении железа или гема [26].

Помимо основных сидерофоров, *P. aeruginosa* вырабатывает ещё один металлофор, кодируемый геном *cntL*, под названием псевдопалин, необходимый в усвоении и использовании в своём патогенезе цинка, кобальта и никеля. Уреаза, которая является никельзависимым ферментом, вырабатывается *P. aeruginosa*, в то время как кобальт необходим для кобаламинзависимой рибонуклеотидредуктазы (NrdJab), выполняющей функцию формирования биоплёнки в условиях ограниченного доступа кислорода [27].

Известно, что у *P. aeruginosa* *sigX* участвует только в транскрипции собственного гена и в значительной степени отвечает за транскрипцию *oprF*, кодирующего основной белок внешней мембраны OprF, который, в свою очередь, участвует в нескольких важнейших функциях: поддержание структуры клетки, проницаемость внешней мембраны, распознавание иммунной системы хозяина [28]. При удалении или нокаутировании генов

algU и *sigX* в геноме PAO1 нарушается формирование биоплёнки [29].

Гены *capB* и *cspD* отвечают за кодирование белков холодового шока, участвующих в адаптации к холоду в окружающей среде [30].

Ген *groES* кодирует белок теплового шока, который помогает выживать микроорганизму при температуре 42°C [31]. Как известно, эти механизмы устойчивости являются неотъемлемой частью физиологии клеток *P. aeruginosa* [31].

σ^{32} -Фактор, кодируемый геном *rpoH*, выступает основным регулятором реакции на тепловой шок, контролируя в том числе работу *groES* [32].

Выбранные гены жизнеобеспечения подтвердили свою релевантность с точки зрения их ключевой роли в жизнедеятельности *P. aeruginosa*, продемонстрировав важность их функционирования для биологических процессов данного микроорганизма. Кроме того, идентификация генов не только идёт по нуклеотидной последовательности, но и транслируется в аминокислотную. Этот способ был выбран для того, чтобы детектировать стоп-кодон в гене и демонстрировать не только его нахождение в геноме, но и функциональность. Таким образом, при оценке качества данных критерием плохого качества генома будет считаться отсутствие одного или более из выбранных генов. Если у генома, выбранного в анализ, показатели N50 будут от 10 000 и выше, но один из генов-кандидатов имеет стоп-кодон, то его можно отнести к геному среднего качества. Вместе с тем, по нашему мнению, использовать геном такого качества для филогенетического анализа, SNP-типирования или MLST-анализа не рекомендуется. При этом поиск в геноме тех или иных генов осуществлять можно, но без использования их для типирования анализируемого штамма.

Несмотря на высокие показатели N50, а также другие параметры оценки, отсутствие двух и более генов указывает на плохое качество данных WGS. Параметр N50 используется для оценки и сравнения качества сборки генома, позволяя выбирать лучшую среди вариантов хорошего/высокого качества (good).

Следующий критерий, с помощью которого оценивали качество данных WGS, стал GC-состав геномов *P. aeruginosa*. Анализируя геномы штаммов с помощью программы «CheckM2», мы заметили, что геномы с показателями Completeness > 97% и Contamination < 3% имеют GC-состав от 63,8 до 66,6%, в связи с чем нами были установлены пороговые значения $65,2 \pm 2,5\%$. Диапазон был выбран шире, чтобы учесть возможные изменения геномного состава. Этот критерий был подкреплён анализом источников литературы, что не противоречило нашим результатам и позволило включить данный параметр в комплексный критерий оценки

качества геномных сборок [33, 34]. Указанный критерий демонстрирует, присутствует ли «контаминация» чужеродной ДНК или ридов родственных видов выбранного генома/геномов для последующего анализа.

Валидация данных WGS с использованием этого критерия происходит по следующему принципу: если выбранный для анализа геном попадает в установленные значения GC-состава, он оценивается как геном хорошего качества. В том случае, если выбранный геном не попадает в установленные значения GC-состава, он оценивается как геном плохого качества.

Качество генома также оценивается по размеру полногеномной последовательности *P. aeruginosa*. Так, для оценки данных WGS были использованы критерии минимального и максимального допустимых размеров генома. За минимальное значение генома был принят размер 5,84 Мб, за максимальное — 8,26 Мб. Основой для принятия решения использования этих значений послужили данные литературы: так, в исследованиях были озвучены показатели, при которых вспомогательный геном может варьировать в пределах 6,9–18,0% [35, 36]. За стандартное значение длины полногеномной последовательности *P. aeruginosa* был принят параметр 6–7 Мб [35, 37].

На основании вышеизложенного, критерием оценки хорошего качества генома *P. aeruginosa* будет являться геном размерами 5,84–8,26 Мб. В случае если анализируемый геном будет выходить за указанные значения, его качество будет оценено как плохое либо среднее, или же следует рассмотреть вариант более детального и пристального анализа данного генома, дабы исключить его структурные особенности.

Геномы, имеющие «средний» уровень, могут быть использованы ограниченно для филогенетического анализа, SNP-типирования или MLST-анализа, однако они могут быть использованы для поиска тех или иных генов (без их типирования) или INDEL-анализа.

Геномы, имеющие «плохой» уровень качества, рекомендуется не брать в биоинформационный анализ и корректировать путём проведения повторного секвенирования.

Кроме программ «CheckM2» и «QUAST», выбранных в качестве инструментов сравнения, существуют программы «SQUAT» и «Plantagora», однако они не соответствуют критериям наших объектов исследования, т. к. разработаны преимущественно для эукариотических организмов. В то же время «CheckM2» является инструментом, разработанным для оценки качества прокариотических геномов, а «QUAST» — универсальная программа. В разработке нашего критерия оценки мы постарались уйти от сложных таблиц с математически-

ми параметрами, оценивающими качество данных WGS, которые предоставляет «QUAST» по итогам анализа. Это предполагает участие в анализе специалистов-биоинформатиков, а также, по нашему мнению, не отражает в полной степени качество WGS данных, а оценивает то, как качественно была проведена сборка генома [3]. В то же время «CheckM2» предоставляет цифровые данные о показателях анализируемого генома по различным параметрам, не давая чётких заключений о том, какого качества геном и можно ли его использовать для дальнейшей работы. Показатель Contamination в некоторых случаях не отражает качества геномов клинических изолятов, содержащих внехромосомные элементы.

Таким образом, мы постарались, с одной стороны, подобрать ясные и чёткие параметры оценки данных WGS, с другой стороны, упростить для пользователя получение конкретного результата, не прибегая к углублённому биоинформатическому анализу, без использования командных строк.

Заключение

Проведено комплексное исследование, в котором нами были отобраны гены жизнеобеспечения, позволяющие оценить качество данных WGS *P. aeruginosa*. Определены критерии оценки качества: размер длины генома, GC-состав, которые позволяют оценить сборку генома *P. aeruginosa*.

На основе валидированных критериев оценки, проверенных на выборке геномов, можно классифицировать сборку генома *P. aeruginosa* по уровню качества исходного материала на три категории: хорошее, среднее и низкое. Хорошее качество — длина генома соответствует среднему размеру генома для вида $\pm 18\%$, доля GC составляет $\pm 2,5\%$ от среднего показателя *P. aeruginosa*, все гены жизнеобеспечения найдены, трансляция их белкового продукта не нарушена стоп-кодоном. Среднее качество — все гены жизнеобеспечения найдены, но обнаружены ошибки их трансляции вследствие образования стоп-кодона из-за ошибки секвенирования. Низкое качество — не найден хотя бы один ген системы жизнеобеспечения либо размер генома или GC-состав не соответствует значению, характерному для вида.

Разработаны алгоритм и общедоступная программа для оперативного анализа на основе данных WGS *P. aeruginosa* «Genomes Validator».

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCE

1. Yang L.A., Chang Y.J., Chen S.H., et al. SQUAT: a Sequencing Quality Assessment Tool for data quality assessments of genome assemblies. *BMC Genomics*. 2019;19(Suppl. 9):238. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5445-3>
2. Barthelsson R., McFarlin A.J., Rounsley S.D., Young S. Plantagora: modeling whole genome sequencing and assembly of plant genomes. *PLoS One*. 2011;6(12):e28436. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028436>

3. 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>
4. Parks D.H., Imelfort M., Skennerton C.T., et al. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res*. 2015;25(7):1043–55. DOI: <https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>
5. Chklovskii A., Parks D.H., Woodcroft B.J., Tyson G.W. CheckM2: a rapid, scalable and accurate tool for assessing microbial genome quality using machine learning. *Nat. Methods*. 2023;20(8):1203–12. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41592-023-01940-w>
6. Manchanda N., Portwood J.L. 2nd, Woodhouse M.R., et al. GenomeQC: a quality assessment tool for genome assemblies and gene structure annotations. *BMC Genomics*. 2020;21(1):193. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6568-2>
7. Manni M., Berkeley M.R., Seppey M., Zdobnov E.M. BUSCO: assessing genomic data quality and beyond. *Curr. Protoc*. 2021;1(12):e323. DOI: <https://doi.org/10.1002/cpz1.323>
8. Дятлов И.А., Миронов А.Ю., Шепелин А.П., Алешкин В.А. Состояние и тенденция развития клинической и санитарной микробиологии в Российской Федерации и проблема импортозамещения. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015;60(8):61–5. Dyatlov I.A., Mironov A.Yu., Shepelin A.P., Aleshkin V.A. The condition and tendencies of development of clinical and sanitary microbiology in the Russian Federation and problem of import substitution. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2015;60(8):61–5. EDN: <https://elibrary.ru/uiqjoh>
9. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30(15):2114–20. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
10. Song L., Florea L., Langmead B. Lighter: fast and memory-efficient sequencing error correction without counting. *Genome Biol*. 2014;15(11):509. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0509-9>
11. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol*. 2012;19(5):455–77. DOI: <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
12. Wood D.E., Lu J., Langmead B. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biol*. 2019;20(1):257. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0>
13. Stover C.K., Pham X.Q., Erwin A.L., et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. 2000;406(6799):959–64. DOI: <https://doi.org/10.1038/35023079>
14. Носков А.К., Попова, А.Ю., Водопьянов, А.С., и др. Молекулярно-генетический анализ возбудителей бактериальных пневмоний, ассоциированных с COVID-19, в стационарах г. Ростова-на-Дону. *Здоровье населения и среда обитания*. 2021;(12):64–71. Noskov A.K., Popova A.Yu., Vodop'yanov A.S., et al. Molecular genetic analysis of the causative agents of COVID-19-associated bacterial pneumonia in hospitals of Rostov-on-Don. *Popul. Health Life Environ*. 2021;(12):64–71. DOI: <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2021-29-12-64-71> EDN: <https://elibrary.ru/srsnhc>
15. Wessel A.K., Liew J., Kwon T., et al. Role of *Pseudomonas aeruginosa* peptidoglycan-associated outer membrane proteins in vesicle formation. *J. Bacteriol*. 2013;195(2):213–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.01253-12>
16. Lu S., Chen K., Song K., et al. Systems serology in cystic fibrosis: anti-pseudomonas IgG1 responses and reduced lung function. *Cell Rep. Med*. 2023;4(10):101210. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2023.101210>
17. Sabzehali F., Goudarzi H., Chirani A.S., et al. Development of multi-epitope subunit vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* using OprF/OprI and PopB proteins. *Arch. Clin. Infect. Dis*. 2021;16(4). DOI: <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2022.61448.13595>
18. Tang Y., Ali Z., Zou J., et al. Detection methods for *Pseudomonas aeruginosa*: history and future perspective. *Rsc Advances*. 2017;7(82):51789–800. DOI: <https://doi.org/10.1039/c7ra09064a>
19. Sevilla E., Bes M.T., Peleato M.L., Fillat M.F. Fur-like proteins: Beyond the ferric uptake regulator (Fur) paralog. *Arch. Biochem. Biophys*. 2021;701:108770. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.108770>
20. Kar A., Mukherjee S.K., Hossain S.T. Regulatory role of PA3299.1 small RNA in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation via modulation of algU and mucA expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2025;748:151348. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2025.151348>
21. Fahey D., O'Brien J., Pagnon J., et al. DinB (DNA polymerase IV), ImuBC and RpoS contribute to the generation of ciprofloxacin-resistance mutations in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mutat. Res*. 2023;827:111836. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2023.111836>
22. Dekker J.P. Within-host evolution of bacterial pathogens in acute and chronic infection. *Annu. Rev. Pathol.* 2024;19:203–26. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-051122-111408>
23. Spinnato M.C., Lo Sciuto A., Mercolino J., et al. Effect of a defective clamp loader complex of DNA polymerase III on growth and SOS response in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microorganisms*. 2022;10(2):423. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020423>
24. Potvin E., Sanschagrin F., Levesque R.C. Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Rev*. 2008;32(1):38–55. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00092.x>
25. Cornelis P., Tahriroui A., Lesouhaitier O., et al. High affinity iron uptake by pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* involves multiple regulators besides Fur, PvdS, and FpvI. *Biometals*. 2023;36(2):255–61. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10534-022-00369-6>
26. Peukert C., Gasser V., Orth T., et al. Trojan horse siderophore conjugates induce *Pseudomonas aeruginosa* suicide and qualify the TonB protein as a novel antibiotic target. *J. Med. Chem*. 2023;66(1):553–76. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c01489>
27. Ghsssein G., Ezzeddine Z. A Review of *Pseudomonas aeruginosa* metallophores: pyoverdine, pyochelin and pseudopaline. *Biology (Basel)*. 2022;11(12):1711. DOI: <https://doi.org/10.3390/biology11121711>
28. Duchesne R., Bouffartigues E., Oxaran V., et al. A proteomic approach of SigX function in *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane composition. *J. Proteomics*. 2013;94:451–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.10.022>
29. Østergaard M.Z., Nielsen F.D., Meinfeldt M.H., Kirkpatrick C.L. The uncharacterized PA3040-3042 operon is part of the cell envelope stress response and a tobramycin resistance determinant in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Spectr*. 2024;12(8):e0387523. DOI: <https://doi.org/10.1128/spectrum.03875-23>
30. Li S., Weng Y., Li X., et al. Acetylation of the CspA family protein CspC controls the type III secretion system through translational regulation of exsA in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(12):6756–70. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkab506>
31. Williamson K.S., Dlakić M., Akiyama T., Franklin M.J. The *Pseudomonas aeruginosa* RpoH (σ32) regulon and its role in essential cellular functions, starvation survival, and antibiotic tolerance. *Int. J. Mol. Sci*. 2023;24(2):1513. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24021513>
32. LaBauve A.E., Wargo M.J. Growth and laboratory maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr. Protoc. Microbiol*.

- 2012;Chapter 6:6E.1.
DOI: <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc06e01s25>
33. Li Y., Bhagirath A., Badr S., et al. The Fem cell-surface signaling system is regulated by ExsA in *Pseudomonas aeruginosa* and affects pathogenicity. *iScience*. 2024;28(1):111629. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.111629>
34. Valot B., Guyeux C., Rolland J.Y., et al. What it takes to be a *Pseudomonas aeruginosa*? The core genome of the opportunistic pathogen updated. *PLoS One*. 2015;10(5):e0126468. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126468>
35. Subedi D., Kohli G.S., Vijay A.K., et al. Accessory genome of the multi-drug resistant ocular isolate of *Pseudomonas aeruginosa* PA34. *PLoS One*. 2019;14(4):e0215038. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215038>
36. Ozer E.A., Allen J.P., Hauser A.R. Characterization of the core and accessory genomes of *Pseudomonas aeruginosa* using bioinformatic tools Spine and AGEnt. *BMC Genomics*. 2014;15(1):737. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-737>
37. Dettman J.R., Rodrigue N., Aaron S.D., Kassen R. Evolutionary genomics of epidemic and nonepidemic strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2013;110(52):21065–70. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1307862110>

Информация о авторах

Ковалевич Алексей Александрович[✉] — м. н. с. лаб. молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института, Ростов-на-Дону, Россия, kovalevich_aa@antiplague.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6926-0239>

Водопьянов Алексей Сергеевич — канд. мед. наук, в. н. с. лаб. молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института, Ростов-на-Дону, Россия, vodopyanov_as@antiplague.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>

Писанов Руслан Вячеславович — канд. биол. наук, в. н. с., зав. лаб. молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института, Ростов-на-Дону, Россия, pisanov.ruslan@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7178-8021>

Участие авторов: Ковалевич А.А. — концепция и дизайн исследования, анализ данных, написание текста; Водопьянов А.С. — разработка программного обеспечения, отладка, редактирование, концепция исследования; Писанов Р.В. — общее руководство исследования, рецензирование и научное редактирование текста рукописи, окончательное утверждение версии для публикации. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации

Статья поступила в редакцию 28.07.2025;
принята к публикации 29.09.2025;
опубликована 31.10.2025

Information about the authors

Alexey A. Kovalevich[✉] — junior researcher, Laboratory of molecular biology of natural focal and zoonotic infections, Rostov-on-Don Anti-plague Scientific Research Institute, Rostov-on-Don, Russia, kovalevich_aa@antiplague.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6926-0239>

Alexey S. Vodopianov — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of molecular biology of natural focal and zoonotic infections, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute, Rostov-on-Don, Russia, vodopyanov_as@antiplague.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>

Ruslan V. Pisanov — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of molecular biology of natural focal and zoonotic infections, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute, Rostov-on-Don, Russia, pisanov.ruslan@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7178-8021>

Authors' contribution: Kovalevich A.A. — research concept and design, data analysis, writing; Vodopyanov A.S. — software development, debugging, editing, research concept; Pisanov R.V. — general research guidance, attract financing, drafting the work, final approval of the version for publication. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 28.07.2025;
accepted for publication 29.09.2025;
published 31.10.2025

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-734>



Генетическое разнообразие мутаций, влияющих на гемолитическую активность бактерий *Bordetella pertussis* при культивировании *in vitro*

Куликов С.В., Медкова А.Ю.[✉], Локтев М.А., Синяшина Л.Н., Каратаев Г.И.

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

Аннотация

Введение. Ключевую роль в патогенезе коклюша, антропонозного инфекционного заболевания, играет двухкомпонентная система BvgAS, регулирующая транскрипцию генов вирулентности возбудителя. Факторы, оказывающие воздействие на работу системы BvgAS бактерий *Bordetella pertussis* в организме человека, практически не изучены. Известно, что нарушение структуры оперона *bvgAS* приводит к фазовым переходам и изменению вирулентности. Перемещение IS-элементов в оперон *bvgAS* и другие гены вирулентности возбудителя коклюша является важным механизмом в регуляции их экспрессии, потенциально приводящим к длительной персистенции бактерий в организме человека.

Цель работы — поиск и характеристика спонтанных инсерционных мутантов бактерий *B. pertussis* по генам вирулентности *bvgAS*, *суа* и *fhaB*, ответственным за гемолитическую активность при культивировании бактерий *in vitro*.

Материалы и методы. Использованы штаммы *B. pertussis* из коллекции НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи: вирулентный штамм *B. pertussis* 475 и изогенный ему аттенуированный штамм *B. pertussis* 4MKS, вирулентный штамм *B. pertussis* Tohama I и его авирулентный мутант *B. pertussis* 347. Бактерии культивировали на казеиново-угольном агаре с добавлением крови. Формирование зон гемолиза оценивали визуально. Для молекулярно-генетической характеристики полученных инсерционных мутантов использовали методы ПЦР, ПЦР-РВ, секвенирования.

Результаты. *In vitro* выделены мутанты *B. pertussis* с нарушенной гемолитической активностью (фенотип Hly⁻) с инсерциями IS-элементов в генах *fhaB* и *bvgAS*, а также мутанты, сохранившие гемолитическую активность (фенотип Hly⁺), содержащие IS-элементы в ранее не описанной ориентации в гене *bvgAS*. Частота образования инсерционных мутантов зависела от условий культивирования и генотипа бактерий.

Заключение. Приведены аргументы, свидетельствующие о возможной роли IS-элементов в переходе бактерий *B. pertussis* в состояние пониженной вирулентности, что обеспечивает длительную персистенцию возбудителя коклюша в организме человека.

Ключевые слова: *Bordetella pertussis*, IS-элементы, регуляция транскрипции, вирулентность, персистенция, гемолитическая активность, Hly⁻-фенотип

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: Куликов С.В., Медкова А.Ю., Локтев М.А., Синяшина Л.Н., Каратаев Г.И. Генетическое разнообразие мутаций, влияющих на гемолитическую активность бактерий *Bordetella pertussis* при культивировании *in vitro*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2025;102(5):592–604.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-734>

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

Genetic diversity of mutations affecting the hemolytic activity of *Bordetella pertussis* bacteria during *in vitro* cultivation

Sergey V. Kulikov, Alisa Yu. Medkova[✉], Matvej A. Loktev,
Lyudmila N. Sinyashina, Gennady I. Karataev

N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. The two-component BvgAS system regulates the transcription of the pathogen's virulence genes and plays a key role in the pathogenesis of whooping cough, an anthroponotic infectious disease. Currently, the factors affecting the BvgAS system of *Bordetella pertussis* bacteria in the human organism have not been studied in practice. It is known that disruption of the *bvgAS* operon structure leads to phase modulations and changes in virulence. IS-elements intergation into the *bvgAS* operon and other virulence genes of *B. pertussis* bacteria is important mechanism in regulating their expression, potentially leading to the long-term persistence of this pathogen in the human body.

Aim. Identification and description of spontaneous IS-elements insertions in *B. pertussis* into *bvgAS*, *cya* and *fhaB* virulence genes responsible for hemolytic activity during *in vitro* bacterial cultivation.

Materials and methods. *B. pertussis* strains from the collection of the N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology were used: virulent *B. pertussis* 475 strain and its isogenic attenuated strain *B. pertussis* 4MKS; virulent *B. pertussis* strain Tohama I and its avirulent mutant *B. pertussis* 347. Bacteria were cultivated on casein-charcoal agar with blood addition. The formation of haemolysis zones was assessed visually. PCR, real-time PCR and sequencing were used for the genetic characterization of the obtained insertion mutants.

Results. *B. pertussis* mutants containing insertions of IS-elements in *fhaB* and *bvgAS* genes with impaired hemolytic activity (Hly⁻ phenotype) have been isolated *in vitro*, as well as *B. pertussis* mutants that retained hemolytic activity (Hly⁺ phenotype), containing IS-elements in a previously undescribed orientation in the *bvgAS* gene. The frequency of insertional mutant formation depended on conditions of cultivation and bacteria genotype.

Conclusion. Arguments are made for the hypotheses about the IS-elements involvement in *B. pertussis* bacteria transition to a state of reduced virulence, which provides the possibility of long-term persistence of this pathogen in the human body.

Keywords: *Bordetella pertussis*, IS-elements, regulation of transcription, virulence, persistence, hemolytic activity, Hly⁻ phenotype

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: Kulikov S.V., Medkova A.Yu., Loktev M.A., Sinyashina L.N., Karataev G.I. Genetic diversity of mutations affecting the hemolytic activity of *Bordetella pertussis* bacteria during *in vitro* cultivation. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(5):592–604.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-734>

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

Введение

Грамотрицательные бактерии *Bordetella pertussis* вызывают острое контагиозное инфекционное заболевание у человека, называемое коклюшем. В роде *Bordetella* принято выделять «классические» виды — *B. pertussis*, *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica*, а также «новые» виды — *B. avium*, *B. petrii*, *B. holmesii*, *B. hinzii*, *B. trematum* и *B. ansorpilii*. В последние годы описаны ещё 3 вида: *B. bronchialis*, *B. flabilis*, *B. sputigena* [1].

Среди факторов вирулентности возбудителя коклюша выделяют две основные группы: токсины и адгезины. К токсинам относят коклюшный токсин, аденилатциклазный токсин (АЦТ), трахе-

альный цитотоксин, дермoneкротический токсин, липополисахаридный эндотоксин. К адгезинам — филаментозный гемагглютинин, агглютиногены, или фимбрии 2 и 3, белок наружной мембраны пертактин, белок BrkA и другие компоненты системы секреции *Bordetella* III типа. Считается, что гемолизин у бактерий *B. pertussis* является АЦТ [2], однако в настоящее время имеются данные о влиянии белка FhaB на гемолиз эритроцитов *in vitro* при взаимодействии с АЦТ [3].

Важной особенностью генома бактерий рода *Bordetella* является наличие в хромосоме повторяющихся инсерционных последовательностей — IS-элементов [4]. Количество и разнообразие

IS-элементов отличается у разных представителей рода. Максимальное число IS481 и IS1002 зарегистрировано в хромосоме *B. pertussis* [4]. Считается, что IS-элементы принимали участие в эволюции бактерий рода *Bordetella* от общего предшественника *B. bronchiseptica* [5].

В патогенезе коклюша особую роль играет двухкомпонентная система BvgAS, состоящая из гистидинкиназы BvgS и белка — регулятора транскрипции BvgA. Система BvgAS выступает ключевым регулятором, контролирующим процесс транскрипции генов, отвечающих за вирулентность бактерий *B. pertussis* [6–8]. Дополнительно система BvgAS регулирует многие внутриклеточные процессы, включая метаболизм *B. pertussis* и взаимодействие «микроб–хозяин» [8]. Уровень продукции и степень фосфорилирования BvgA~P определяет уровень транскрипции bvg-зависимых генов. Уровень фосфорилирования BvgA~P определяется активностью и количеством фосфокиназы BvgS, зависящей от ряда факторов, в том числе от условий культивирования. В зависимости от функционирования системы BvgAS бактерии *B. pertussis* могут находиться в вирулентном состоянии — I фаза (Bvg⁺), авирулентном — IV фаза (Bvg[−]) или в промежуточной фазе Bvgⁱ, каждая из которых вносит вклад в патогенез коклюша, сохранение бактерий в организме человека и их передачу новому хозяину.

Несмотря на отсутствие информации о факторах, оказывающих воздействие на работу системы BvgAS в живом организме, описаны некоторые условия, изменяющие степень вирулентности бактерий *B. pertussis* при культивировании *in vitro* на плотных питательных средах [6–8]. Так, снижение температуры культивирования до 27°C, добавление в питательную среду 50 мМ сульфата магния или никотиновой кислоты способствуют переходу бактерий в авирулентную фазу.

Изменение фазового состояния бактерий *B. pertussis* может происходить в результате нарушения структуры оперона вирулентности *bvgAS*. Описаны два типа индуцированных мутаций, вызывающих изменение фенотипа *B. pertussis*. Первые мутанты без гемолитической активности (с отсутствием зон гемолиза на питательных средах с добавлением крови, Hly[−]-мутанты) были отобраны при культивировании лабораторного вирулентного штамма *B. pertussis* Tohama I в присутствии эритромицина [9]. Основной фенотипической характеристикой Hly[−]-мутантов было отсутствие зон гемолиза вокруг отдельных колоний, выросших на среде Борде–Жангу с добавлением крови барана. Частота выявления Hly[−]-мутантов охарактеризована авторами как 10^{−5}–10^{−6}. В 1989 г. опубликована работа S. Stibitz и соавт., в которой было проведено картирование и секвенирование мутантной по гемолитической активности области *B. pertussis* Tohama I.

Показано, что Hly[−]-мутанты содержали *frameshift* (f.s.) мутацию, связанную с приобретением цитозина в последовательности из 6 цитозинов в гене *bvgS* [10]. Другой тип мутантов *B. pertussis* в штамме Tohama I был выделен S. Stibitz в 1998 г. [11]. Мутанты по оперону *bvgAS* оказались жизнеспособными в селективных условиях, характеризующихся суперпродукцией мутантного белка BvgA, клонированного в составе плазмиды. Авторами были охарактеризованы 15 инсерционных мутантов *B. pertussis*, выживших в указанных условиях, у 7 из которых определены соответствующие последовательности. Пять мутантов содержали IS481, 2 мутанта — IS1002 в *cctagc*-сайте оперона *bvgAS* [12]. В наших исследованиях было показано, что мутанты *B. pertussis*, подобные полученным в экспериментах *in vitro*, обнаружены у поздних реконвалесцентов коклюша, у бессимптомных носителей, контактных с больными коклюшем [13], а также при экспериментальном коклюше у низших обезьян Старого Света на поздней стадии инфекционного процесса [14].

В последние десятилетия от больных коклюшем выделены различные типы нокаутных и регуляторных мутантов по генам вирулентности *fhaB*, *katA*, *prn*, *brkA* *B. pertussis*, содержащих инсерции IS-элементов. Предполагается, что накопление в популяции таких мутантов *B. pertussis* связано с широким использованием в ряде стран бесклеточных коклюшных вакцин [15–18].

Нами предложена гипотеза, согласно которой IS-элементы принимают участие в регуляции экспрессии генов вирулентности и генов «домашнего хозяйства» возбудителя коклюша, что является одним из механизмов длительного сохранения бактерий *B. pertussis* и формирования персистенции в организме человека и обуславливает циркуляцию и поддержание очагов антропонозной инфекции.

Целью настоящего исследования явились поиск и характеристика спонтанных инсерционных мутантов бактерий *B. pertussis* по генам вирулентности *bvgAS*, *cya* и *fhaB*, ответственным за фенотип Hly[−], формирующихся в процессе культивирования бактерий *in vitro*.

Материалы и методы

В работе использованы штаммы бактерий *B. pertussis* из коллекции НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи: вирулентные бактерии *B. pertussis* 475 и изогенные им аттенуированные бактерии *B. pertussis* 4MKs Str^RNal^RCm^R [19]; вирулентные бактерии *B. pertussis* лабораторного штамма Tohama I и его авирулентные мутанты *B. pertussis* 347 *bvgAS::Tn5* Str^RKm^R.

Бактерии *B. pertussis* культивировали на казеиново-угольном агаре («Медгамал») с добавлением крови барана в концентрации 15% при 35°C в тече-

ние 24–36 ч для роста культуры и в течение 72–96 ч для формирования колониеобразующих единиц (КОЕ). Подсчёт количества колоний, характеристику их размера и формы проводили визуально. Отсутствие посторонней микрофлоры контролировали с помощью световой микроскопии после окрашивания по Грамму.

Для выделения ДНК бактерий *B. pertussis* использовали набор для выделения ДНК-сорб-В («Амплисенс»). Для очистки продуктов амплификации — набор для выделения и очистки ДНК из агарозного геля («Евроген»).

Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (ПЦР-РВ) использовали амплификатор «CFX96 Touch» («BioRad»), для ПЦР — прибор фирмы «Терцик».

Последовательность нуклеотидов продуктов амплификации определяли на приборе «3130 GeneticAnalyzer» («AppliedBiosystems/Hitachi»).

Результаты

Метод регистрации интеграции IS-элементов в оперон *bvgAS*

Среди описанных мутаций в генах вирулентности возбудителя коклюша особого внимания, согласно нашей гипотезе, заслуживают инсерционные мутации — интеграции IS-элементов в специфический сайт оперона *bvgAS* *B. pertussis*. В предыдущих

работах нами описаны метод и тест-системы для выявления мутаций в опероне *bvgAS*, содержащем интеграции IS-элементов 481 и 1002 в определённой, на тот момент единственной известной ориентации, которую мы условно обозначили ориентация (1) [13].

С целью выявления мутантов *B. pertussis*, содержащих интеграции IS-элементов 481 и 1002 с ранее не описанной противоположной ориентацией по отношению к известной ориентации (1), нами модифицирована разработанная ранее система ПЦР-РВ. Новая ориентация условно обозначена как ориентация (2).

Интеграции IS-элементов 481 и 1002 в ориентации (2) — IS481 (2) и IS1002 (2), положение праймеров и зондов схематически изображены на **рис. 1**. В **табл. 1** представлены нуклеотидные последовательности зондов и праймеров, в том числе фланкирующих специфические сайты *NctagN*, расположенные в структуре генов *суа* и *fhaB*.

Температурно-временной профиль ПЦР-РВ и ПЦР для регистрации интеграций IS481 и IS1002 в ориентации (2) и в *NctagN*-сайт оперона *bvgAS* и генов *суа* и *fhaB* представлен в **табл. 2**.

Специфичность выбранных праймеров и зондов подтверждена определением нуклеотидной последовательности соответствующих продуктов амплификации. Количество геном-эквивалентов (ГЭ) ДНК *B. pertussis* и интеграций IS481 (1) и IS1002 (1) определяли с помощью тест-систем ПЦР-РВ

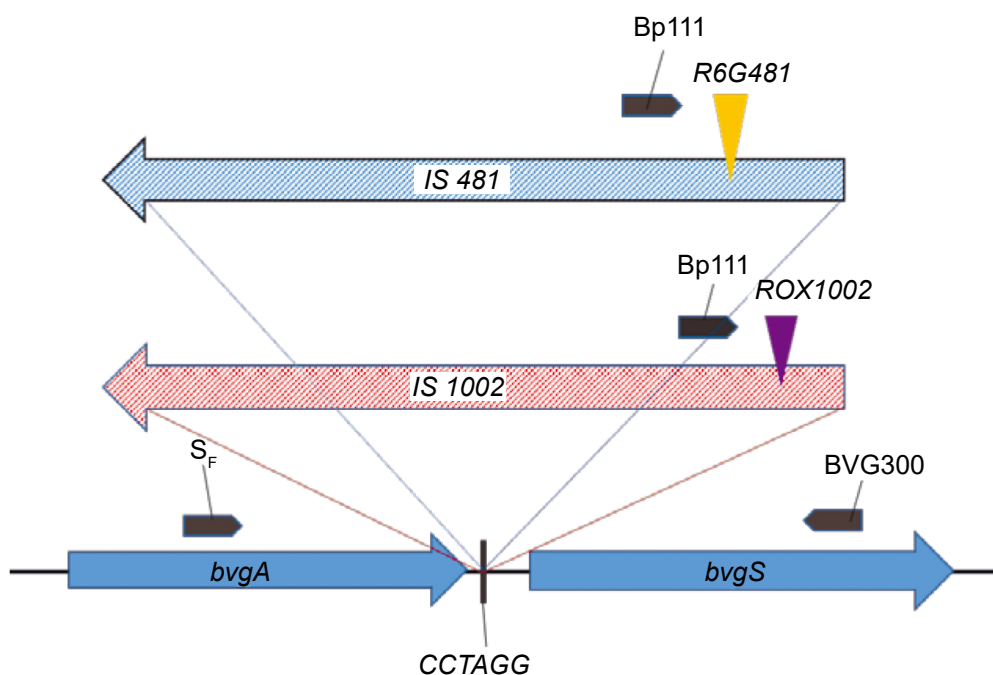


Рис. 1. Структура участка хромосомы *B. pertussis*, содержащего интеграцию IS481 (2) или IS1002 (2) в *cctagg*-сайте оперона *bvgAS*.

Заштрихованные стрелки показывают положение интегрированного элемента IS481 (синяя стрелка) или IS1002 (красная стрелка) в *cctagg* сайт оперона *bvgAS* (синие сплошные стрелки). Темными пятиугольниками обозначено положение праймеров, использованных для амплификации. Цветными треугольниками обозначено положение ДНК-зондов, использованных в реакции гибридизации ПЦР-РВ.

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов, использованные для регистрации интеграций IS-элементов 481 и 1002 в ориентации (2) — IS481 (2) и IS1002 (2) — в гены *bvgAS*, *cya* и *fhaB*

Праймер/зонд	Нуклеотидная последовательность
ПЦР-PB	
Bp111	GGTCAATCGGGCATGCTTATGG
BVG300	ACGTGCAACGGAGGAATGTC
R6G481, зонд	(R6G)TCGCCGACCCCCAGTTCACTCAAG(BHQ1)
Rox1002, зонд	(ROX)ACCACGCCATCGCAACTCAGGGCA(BHQ2)
ПЦР <i>bvgAS</i>::IS; ПЦР <i>cya</i>::IS; ПЦР <i>fhaB</i>::IS	
CyaF	CCATGTCGAGCTGGCCCGTG
CyaR	GGCCACTTCTCGACCGTGCC
FhaB1-F	GGCTGAGCCGTTTCGACCTT
FhaB1-R	CACGGTCGTTTCAGCGCAACA
S _F	GTCGCTGGTGGAACTGATAG

Таблица 2. Температурно-временные профили ПЦР-PB и ПЦР для регистрации интеграций IS-элементов в NctagN сайт оперона *bvgAS*, *cya* и *fhaB*

Мишень	Праймеры/зонд	Температура, °C	Время, с	Количество циклов
ПЦР-PB <i>bvgAS</i> ::IS481 (2)	Bp111-BVG300/R6G481	95	300	1
		95	20	} 40
		60	50	
ПЦР-PB <i>bvgAS</i> ::IS1002 (2)	Bp111-BVG300/Rox1002	95	300	1
		95	20	} 40
		60	50	
ПЦР <i>bvgAS</i> ::IS	S _F -BVG300	95	300	1
		95	20	} 40
		63	30	
		72	30	
ПЦР <i>cya</i> ::IS	CyaF-CyaR	95	300	1
		95	20	} 40
		67	30	
		72	30	
ПЦР <i>fhaB</i> ::IS	FhaB1-F-FhaB1-R	95	300	1
		95	20	} 40
		67	30	
		64	30	

(BpIS-Q) и ПЦР-PB BpIS-INT1 [13] соответственно. Количество интеграций IS481 (2) и IS1002 (2) оценивали по значениям предельных циклов реакции. Соответствующий набор реактивов, по аналогии с набором для количественной оценки интеграций IS-элементов в ориентации (1) обозначен как BpIS-INT2. Частоту интеграций, как и прежде, рассчитывали по соотношению $N_{IS}/N_{ГЭ}$, где N_{IS} — количество интеграций, а $N_{ГЭ}$ — количество ГЭ в 5 мкл раствора исследуемой ДНК.

Фенотип бактерий *B. pertussis* 4MKS, 475, Tohama I и Tohama 347 и молекулярно-генетическая характеристика их популяций

В рамках настоящего исследования был проведён анализ популяций бактерий лабораторного

штамма *B. pertussis* Tohama I и его Bvg⁻-мутанта *B. pertussis* Tohama 347, а также вирулентных бактерий *B. pertussis* 475 и изогенных аттенуированных бактерий *B. pertussis* 4MKS с целью выявления инсерционных мутантов в генах вирулентности *bvgAS*, *cya* и *fhaA*, ответственных за фенотип Hly⁻, формирующийся при культивировании бактерий *B. pertussis* *in vitro*.

B. pertussis представляют собой медленно растущие, прихотливые к условиям культивирования бактерии. Для фенотипической дифференциации фазовых состояний бактерий *B. pertussis* при культивировании на твёрдой питательной среде с добавлением крови могут быть использованы характеристики КОЕ: размер, форма колоний и наличие зон гемолиза. Bvg⁺-колонии — выпуклые, ровные, блестящие

мелкие (1–2 мм), образуют выраженные зоны гемолиза; Bvg⁺-колонии — плоские, шероховатые, более крупные (2,0–2,5 мм), зон гемолиза не образуют.

КОЕ бактерий *B. pertussis*, выросших на казеиново-угольном агаре (КУА) с кровью, проанализированы по перечисленным параметрам. Культуру *B. pertussis* из ампулы высевали на чашку Петри с КУА с добавлением крови (высев), после инкубации при 35°C в течение 24–36 ч пересевали плотным штрихом на такую же чашку Петри (первый пассаж). После контроля микробиологической чистоты методом световой микроскопии осуществляли ещё один пересев (2-й пассаж). Культуру 3-го пассажа использовали для посева ампульной культуры до отдельных колоний методом титрования (анализ ампульной культуры). Параллельно отдельные колонии 2-го пассажа, выросшие на среде КУА с кровью, анализировали по морфологии и наличию зон гемолиза. Три КОЕ каждого штамма, соответствующие критериям вирулентных бактерий *B. pertussis*, пересевали штрихом на свежие чашки Петри с КУА с добавлением крови, из выросшей культуры выделяли ДНК, одновременно рассевали бактерии методом титрования до формирования КОЕ на среде КУА с кровью. КОЕ анализировали по морфологии и наличию зон гемолиза (анализ культуры из отдельных КОЕ). В рамках настоящего исследования охарактеризовано 500–1000 КОЕ каждого штамма вирулентных и аттенуированных бактерий *B. pertussis*, выращенных из ампульной культуры и отдельных КОЕ.

Проведён фенотипический и молекулярно-биологический анализ бактерий *B. pertussis*, высушенных в разное время в разных лабораториях. КОЕ ампульных культур 3-го пассажа бактерий *B. pertussis* 4MKS и *B. pertussis* 475 в подавляющем большинстве содержали бактерии в вирулентной Bvg⁺-фазе, интеграции IS-элементов в опероне *bvgAS* регистрировали в ПЦР-РВ с низкой частотой — менее 10⁻⁴ на одну бактериальную клетку. В посевах ампульных культур все выросшие колонии имели фенотип Bvg⁺.

В отдельных случаях в бактериях *B. pertussis* 4MKS из 3-го пассажа ампульной культуры, высу-

шенной более 4 лет назад, суммарная частота инсерционных мутантов в обеих ориентациях составила (2–5) × 10⁻² (табл. 3). При посеве регистрировали около 2–3% Hly⁺-КОЕ. Колонии имели плоскую и шероховатую форму и размер 2,0–2,5 мм, Hly⁺-колонии — 1–2 мм.

Схожие результаты были получены при исследовании ампульных культур *B. pertussis* Tohama I. Частота интеграций IS481 (1) в опероне *bvgAS*, зарегистрированная с помощью ПЦР-РВ, составила от 10⁻⁴ на бактерию до нескольких процентов. Интеграций других IS-элементов в бактериях *B. pertussis* Tohama I не обнаружено. Максимальное количество КОЕ, не образующих зон гемолиза, достигавшее 95% от общего числа колоний, выявлено при посеве бактерий высушенных 13.04.1974 (30 лет назад). При этом частота интеграций IS-элементов в опероне *bvgAS* составила 4 × 10⁻² на бактерию (табл. 3).

КОЕ штамма *B. pertussis* Tohama 347 *bvgAS*::Tn5 ожидаемо не образовывали зон гемолиза, размер и форма колоний соответствовали фенотипу Bvg⁺. Частота интеграций во всех проанализированных с помощью ПЦР-РВ культурах *B. pertussis* Tohama 347 составила меньше 10⁻⁶ на бактерию.

Такое же исследование было проведено с культурами, выращенными из отдельных Hly⁺-колоний *B. pertussis* 475, *B. pertussis* 4MKS и *B. pertussis* Tohama I. При посеве бактерий каждого штамма из отдельных колоний на среде КУА с добавлением крови из 10³ КОЕ не было обнаружено колоний, не образующих зон гемолиза. Размер и форма колоний соответствовали описанному выше фенотипу Bvg⁺. Частота интеграций IS-элементов в опероне *bvgAS* не превышала 10⁻⁴–10⁻⁵ на бактерию.

Колонии Hly⁺-штаммов *B. pertussis* 4MKS и *B. pertussis* Tohama I выборочно были подвергнуты дальнейшему анализу. По 46 колоний каждого штамма перенесли на чашки Петри с КУА с добавлением крови и антибиотиками для проверки их устойчивости к антибиотикам и способности к гемолизу. В результате все отдельные колонии *B. pertussis* 4MKS были устойчивы к стрептоми-

Таблица 3. Доля Hly⁺-колоний и регистрация событий интеграции IS-элементов в опероне *bvgAS* бактерий *B. pertussis* 475, *B. pertussis* 4MKS и *B. pertussis* Tohama I при их культивировании на среде КУА с кровью

Штамм	Ампульная культура		Культура из КОЕ	
	Hly ⁺ , %	<i>bvgAS</i> ::IS*	Hly ⁺ , %	<i>bvgAS</i> ::IS*
<i>B. pertussis</i> 475	НО	5 × 10 ⁻⁵	НО	3 × 10 ⁻⁵
<i>B. pertussis</i> 4MKS	2	(2–5) × 10 ⁻²	НО	2 × 10 ⁻⁴
<i>B. pertussis</i> Tohama I	95	4 × 10 ⁻²	НО	5 × 10 ⁻⁴
<i>B. pertussis</i> Tohama 347	100	≤ 10 ⁻⁶	100	≤ 10 ⁻⁶

Примечание. *Приведена суммарная частота интеграции по всем IS-элементам. Для ПЦР использована ДНК, выделенная из 3-го посева ампульной культуры или КОЕ; НО — не обнаружено.

цину, налидиксовой кислоте и хлорамфениколу, а бактерии *B. pertussis* Tohama I были чувствительны ко всем проверенным антибиотикам. Выявленная устойчивость к антибиотикам полностью соответствует характеристикам родительских штаммов *B. pertussis* 4MKS и *B. pertussis* Tohama I. КОЕ обоих штаммов сохраняли выраженный фенотип Hly⁻ в репликах.

В ПЦР с праймерами S_F-BVG300 в ДНК, выделенной из посева 3-го пассажа ампульных культур и КОЕ тестируемых штаммов, не зарегистрировано фрагментов большого размера, несмотря на наличие у части бактерий в популяции интеграции IS-элемента. Отсутствие продуктов амплификации со вставкой обусловлено значительно более низкой эффективностью амплификации больших фрагментов в сравнении с маленькими фрагментами без вставки.

Таким образом, в культурах проанализированных штаммов вирулентных и аттенуированных бактерий *B. pertussis*, выращенных из ампульных куль-

тур, с разной частотой регистрируются Hly⁻-мутанты, не обладающие гемолитической активностью и содержащие интеграции IS-элементов в опероне *bvgAS*. Культура, выращенная из отдельных колоний бактерий, гомогенна и содержит инсерционные мутанты с частотой меньше 10⁻⁴ на бактерию. Популяции бактерий, выращенные из отдельных колоний, содержат негемолизирующие колонии бактерий фенотипа Hly⁻ в количестве, недостаточном для фенотипического анализа.

Молекулярно-генетическая характеристика Hly⁻-мутантов *B. pertussis* 4MKS и Tohama I

Из 40 реплик каждого штамма *B. pertussis* 4MKS и *B. pertussis* Tohama I, с Hly⁻-фенотипом была выделена ДНК. Полученные образцы проанализировали с помощью ПЦР с праймерами S_F-BVG300, FhaB1-F-FhaB1-R и CyaF-CyaR.

Размер продуктов амплификации с праймерами S_F-BVG300 исследованных Hly⁻-мутантов

a

GGAAGTATAGACCTCGCCAAACGCAACAATCTCGCCTAGCGCCGCGCATGCCCCGCCCCGCACCG
CCTGTACCCCCGAGTCTGATCTGCCTGGCTCAGGCGCTATTGGCATGGGCTTTGCTgGCATGGGC
GCCCCGCGCA

б

GGAAGTATAGACCTCGCCAAACGCAACAATCTCGCCTAGCGCCGCGCATGCCCCGCCCCGCACCG
CCTGTACCCCCGAGTCTGATCTGCCTGGCTCAGGCGCTATTGGCATG

Рис. 2. Фрагмент последовательности оперона *bvgAS* дикого типа *B. pertussis* (а) и Hly⁻-мутанта *B. pertussis* № 33 (б).

Заглавными буквами представлены нуклеотидные последовательности оперона *bvgAS*; ATG — метиониновый кодон гена *bvgS*; **tg** — делеция; CCTAGC — специфический сайт интеграции IS-элементов.

Таблица 4. Результаты ПЦР-анализа ДНК клонов *B. pertussis* 4MKS с фенотипом Hly⁻ (выборочно)

Номер клона на матрицах штампов	Гены, типы мутаций		
	<i>bvgAS</i> ::IS	<i>fhaB</i> ::IS	<i>cya</i> ::IS
2	IS481 (2)*	НО*	НО
3	IS481 (2)*	НО	НО
49	IS481 (2)*	НО	НО
48	IS481 (2)*	НО	НО
22	IS481 (2)*	НО	НО
9	IS1002 (1)*	НО	НО
10	IS1002 (1)*	НО	НО
32	IS1002 (1) *	НО	НО
34	IS1002 (1) *	НО	НО
43	IS1002 (1) *	НО	НО
31	НО*	IS481 (1)*	НО
33	ΔTG*	НО	НО
3-2	НО	IS481 (1) *	НО
32-2	НО*	НО*	НО
15-2	НО*	НО	НО
17-2	НО*	НО	НО
28-2	НО	IS481 (1) *	НО

Примечание. *Структура подтверждена секвенированием. НО — интеграции методом ПЦР не обнаружено.

6
 tgaacctgcatacaacctattgaatctTcacacctaacgagcacggacttctccgcgccacgcgggacggaagaacgccggac
 aggccgcggttacaacatggtatccggcgggctggttgccgtcgccgcgcgccgatccggccatcgccgccccaaaccacgga
 qqacccgcacata^a ttgaqcaac

Заглавными буквами обозначена последовательность оперона *bvgAS*, подчеркнут специфический сайт интеграции CCTAGC; курсивом выделена последовательность гена *bteA*, подчеркнут специфически вырожденный сайт интеграции *cctaac*; стартовые кодоны метионина белков BvgS и BteA выделены жирным шрифтом; строчными буквами обозначена последовательность 3'-конца IS481(1); жирной заглавной буквой **T** — предполагаемый старт транскрипции.

Продукты ПЦР 40 проанализированных Hly-мутантов *B. pertussis* Tohama I с использованием пар праймеров S_F-BVG300, FhaB1-F-FhaB1-R и CyaF-CyaR имели близкий к расчётному размер — около 300, 388 и 261 п. н. соответственно. Определение последовательности нуклеотидов 3 ампликонов: *bvgAS*, *cya* и *fhaB* подтвердило отсутствие в них интеграций IS-элементов и не выявило нарушений их структуры по сравнению с нативной.

Таким образом, появление бактерий *B. pertussis* с фенотипом Hly⁻ при культивировании на плотной питательной среде обусловлено не только известными ранее мутациями сдвига рамки считывания в *bvgS*, делециями и вставками в гене *bvgA*, интеграцией IS481 (2) и IS1002 (1) в межгенное пространство оперона *bvgAS* или делециями в гене *bvgS*, которые были обнаружены в данном исследовании, но и вновь выявленными вставками IS-элементов в ген *fhaB*. Перемещение IS481 (1) в *cctagc* сайт оперона *bvgAS* *B. pertussis* Tohama I не приводит к формированию выраженного Hly⁻ фенотипа бактерий. ПЦР-анализ фрагментов генов вирулентности *bvgAS*, *cyu* и *fhaB*, содержащих специфические сайты *NctagcN*, не выявил видимых изменений структуры анализируемых участков генов у Hly⁻ мутантов *B. pertussis* Tohama I.

В наших предшествующих работах показано, что популяция вирулентных бактерий *B. pertussis*, культивируемых на твёрдой среде КУА, не является однородной, в ней присутствовала определённая доля мутантов, характеризующихся вставками IS-элементов в специфическом сайте оперона *hlyAS*. Такие мутанты были описаны не только на-

ми, но и получены и охарактеризованы в селективных условиях *S. Stibitz* и соавт. В наших исследованиях инсерционные *BvgAS*-мутанты обнаружены у реконвалесцентов и контактных по коклюшу лиц, у экспериментальных животных на поздних стадиях коклюшной инфекции. Используемая в экспериментах разработанная нами ранее тест-система ПЦР-РВ позволяла учитывать события интеграции IS1002 и IS481 только в одной ориентации, названной нами (1). Мы предположили, что IS-элементы способны перемещаться и интегрироваться в специфический сайт оперона *bvgAS* и в обратной ориентации (2). Поэтому в настоящей работе предпринята разработка метода, позволяющего выявлять события интеграции IS-элементов в оперон *bvgAS* в ориентации (2) и регистрация соответствующих инсерционных мутантов *B. pertussis* при культивировании *in vitro*.

Для проведения ПЦР и регистрации продуктов амплификации, возникающих в результате интеграции IS-элементов в обеих ориентациях, использованы одни и те же праймеры и зонды, комплементарные последовательностям IS-элементов, но в парах с праймером S_F для ориентации (1) и с BVG300 для ориентации (2) (рис. 1). Для оценки количества интеграций в ориентации (2) в рамках настоящей работы использовали значения предельных циклов реакций, а не калибровочные кривые, как в предыдущих экспериментах, что несколько уменьшает точность количественного определения интеграций.

В независимых экспериментах при расщепе бактерий всех штаммов, выращенных из КОЕ, за исключением *B. pertussis* Tohama 347, частота выявления событий интеграции с помощью ПЦР-РВ существенно не отличалась от определённой нами ранее и составила 10^{-4} – 10^{-5} на бактерию.

В настоящем исследовании нами проанализированы культуры *B. pertussis* 4MKS и *B. pertussis* 475, высушенные в разное время в нашей лаборатории, а также культуры *B. pertussis* 475, полученные в разное время из разных источников, в том числе из коллекции ГНИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича. Во всех ампульных культурах были выявлены интеграции IS-элементов как в ориентации (1), так и ориентации (2). В ходе анализа 16 препаратов в 7 из них интеграция IS1002 в оперон *bvgAS* отсутствовала либо в одной, либо в обеих исследованных ориентациях. Интеграция IS481 присутствовала в опероне *bvgAS* в ориентации (1) в 75% случаев и в ориентации (2) в 25% случаев. Только в одной ампульной культуре штамма *B. pertussis* 475 интеграция IS 481 не была зарегистрирована. В 25% случаев не выявлено интеграции IS1002 (1), а в 3 (16%) образцах не выявлено интеграций как IS1002 (1), так и IS 1002 (2). Таким образом, частота ре-

гистрации IS-элементов в опероне *bvgAS* двух изогенных штаммов снижается в последовательностях IS481 (1), IS481 (2), IS1002 (1) и IS1002 (2). Достоверность и значимость выявленных закономерностей для других штаммов бактерий *B. pertussis* предстоит выяснить в последующих исследованиях.

Среди проанализированных Hly^- -клонов ампульных культур *B. pertussis* 4MKS не выявлено интеграций IS1002 (2) и IS481 (1) (табл. 4), в то время как они регистрируются методом ПЦР-РВ в общей популяции *B. pertussis* 4MKS. Предположительно, такие инсерционные мутанты находятся среди бактерий с фенотипом Hly^+ . Анализ 10 отпечатков КОЕ, формирующих зоны гемолиза, не выявил изменений в размере соответствующего ампликона, что указывает на невысокий процент возможных инсерционных мутантов в популяции Hly^+ -клонов. Результаты ПЦР-РВ анализа бактериальной популяции, включающей изученные Hly^- и Hly^+ -клоны, подтверждают данное заключение: частота обнаружения интеграций IS1002 (2) и IS481 (1) в 10 раз ниже, чем IS1002 (1) и IS481 (2), регистрируемых с частотой около 10^{-2} на бактерию. Однако поиск интегрантов, не имеющих фенотипических признаков, с ожидаемой частотой меньше 10^{-3} на бактерию представляется затруднительным. По этой причине Hly^+ -клоны с возможными интеграциями IS1002 (2) и IS481 (1) остались за рамками настоящего исследования.

В популяции бактерий *B. pertussis* Tohama I в опероне *bvgAS* выявлена интеграция только IS481 (1) и не обнаружено интеграций IS1002. При расщепе тестируемых культур, выращенных из КОЕ, не выявлено колоний с фенотипом Hly^- на среде КУА с кровью, что согласуется с частотой выявления событий интеграции методом ПЦР-РВ. Факт интеграции преимущественно IS481 (1) в специфический сайт оперона *bvgAS* бактерий *B. pertussis* Tohama I, как и разная частота при интеграции IS481 и IS1002 у изогенных вариантов штамма *B. pertussis* 475, требует дальнейшего изучения и может быть связана с особенностью перемещения IS-элементов у разных штаммов.

Частота интеграций IS481 в культуре бактерий *B. pertussis* Tohama 347, выращенных из ампулы и КОЕ, примерно в 100 раз ниже (10^{-6} – 10^{-7} на бактерию), чем у изогенных вирулентных бактерий *B. pertussis* Tohama I. Этот факт был отмечен нами в предшествующих исследованиях [20, 21]. Анализ продукта амплификации ДНК *B. pertussis* Tohama 347 с праймерами S_F -BVG300 показал, что инсерция Tn5 в опероне *bvgAS* расположена вне анализируемого фрагмента оперона вирулентности и, вероятно, не способна препятствовать перемещению IS-элементов в анализируемый сайт. Это обстоятельство указывает на зависимость частоты транспозиции от целостности оперона *bvgAS*. Сле-

дует отметить, что нам не удалось зарегистрировать зависимость частоты транспозиции IS-элементов в оперон *bvgAS* от модулирующих условий при культивировании бактерий *B. pertussis* Tohama I, 4MKS и 475 в присутствии $MgSO_4$ и пониженной температуры. С одной стороны, данное наблюдение не подтверждает зависимости транспозиции от модулирующих условий, а с другой, учитывая выявленное снижение частоты интеграций у *B. pertussis* Tohama 347, можно предположить, что белки Bvg A и Bvg S не принимают непосредственного участия в регуляции транспозиции. Полученный эмпирический результат требует дальнейшего изучения.

Обнаруженные нами с высокой частотой инсерционные мутанты *B. pertussis* в некоторых ампульных культурах свидетельствуют о выраженной зависимости частоты транспозиции от условий культивирования бактерий, в том числе, вероятно, и в организме хозяина. Возможно, этим обстоятельством обусловлена нестабильность получения мутантов сдвига рамки и их ревертантов, отмеченная A. Weiss и соавт. [9].

Таким образом, представленные результаты показывают, что предложенные нами тест-системы ПЦР-РВ позволяют регистрировать события интеграции IS-элементов в обеих ориентациях в оперон *bvgAS*. Частота их транспозиции зависит от генотипа, в том числе от целостности оперона вирулентности, и условий культивирования бактерий.

Анализ структуры фрагментов генов вирулентности *bvgAS*, *суа* и *phaB* Hly-мутантов показал, что они содержат интеграцию IS481 (2) или IS1002 (1) в специфическом *cctagc* сайте оперона *bvgAS* (*B. pertussis* 4MKS), либо IS481 (1) в аналогичном сайте *phaB* (*B. pertussis* Tohama I). Обнаружены также 4 Hly-мутанта, хромосома которых не имеет инсерций в тестированных фрагментах генов вирулентности. В гене *bvgS* одного из них обнаружена делеция 2 нуклеотидов, нарушающая экспрессию фосфокиназы Bvg S, участвующей в регуляции большого количества генов возбудителя коклюша, в том числе всех генов вирулентности. В 3 из 4 Hly-мутантов использованные методы не выявили нарушений в структуре генов *bvgAS* или *phaB*. Ни в одном из проанализированных клонов не было интеграций в гене *суа*. Вероятно, что эти 3 мутанта содержат охарактеризованные S. Stibitz инсерции IS-элементов в гене *bvgA* или другие, например, f.s.-мутации в гене *bvgS*, не выявленные нами с помощью использованных методов.

Наличие интеграции одного из IS-элементов в межгенное пространство оперона *bvgAS*, блокирующей транскрипцию гена *bvgS*, представляется вполне ожидаемой причиной формирования фенотипа Hly-мутантов *B. pertussis* 4MKS. Однако существует несколько примеров интеграции IS481 в специфический сайт, расположенный *up stream*

генов *brkA*, *kat*, *bvgS*, *fim*, как минимум не сопровождающихся прекращением их экспрессии [16, 18, 20, 22]. В одной из работ не только сформулировано предположение, что транскрипция с промотора, расположенного на конце IS481, регулирует экспрессию продукта гена *brkA*, но и определено начало соответствующего транскрипта (рис. 2). Выявленный авторами промотор расположен на том же конце IS481 (2) в геноме клона 49 *B. pertussis* 4MKS, но, по-видимому, не обеспечивает достаточный уровень транскрипции гена *bvgS*, в результате чего формируется фенотип Hly-клона 49 (рис. 2). Можно предположить, что нарушение транскрипции гена *bvgS* у мутантов, содержащих инсерцию IS1002 (1), происходит по такому же механизму или в результате полного её прекращения. Отсутствие экспериментальных данных о наличии промоторов в структуре IS1002 пока не позволяет сделать окончательный вывод. По-видимому, подобным образом, инсерция IS481 обеспечивает транскрипцию гена *bvgS* и дифференциальную экспрессию генов вирулентности отобранных S. Stibitz мутантов, проявляющуюся в сохранении, но значительном снижении экспрессии генов *ptx* и менее выраженном снижении *pha* [20]. Интересный случай регуляции транскрипции рассмотрен A. D'Halluina и соавт. [22]. Показана регуляция транскрипции/трансляции гена *fim2* в результате синтеза антисмысловой РНК с внутреннего промотора IS481, интегрированного выше гена *fim2*. Предполагается, что описанные изменения регуляции генов вирулентности *B. pertussis*, в особенности оперона *bvgAS*, могут быть одним из «пусковых» механизмов формирования персистенции бактерий *B. pertussis* в организме единственного хозяина — человека. Или могут повышать жизнеспособность бактерий вне организма, облегчая передачу инфекции новому восприимчивому организму.

Во всех Hly-мутантах, содержащих инсерцию в гене *phaB*, была обнаружена интеграция IS481 (1). Поскольку интеграции расположены в кодирующей последовательности гена *phaB*, они нарушают его транскрипцию и трансляцию, независимо от направления интеграции IS-элемента. Если взаимосвязь мутаций в опероне *bvgAS* с Hly-фенотипом представляется очевидной, то влияние нокаутной мутации в гене *phaB* на гемолитическую активность *B. pertussis* требует дальнейшего изучения. Согласно современным представлениям, белок PhaB не имеет прямого отношения к реакции гемолиза эритроцитов крови. Эта функция приписывается АЦТ, точнее его С-концевому участку. Однако последние данные говорят о том, что белок PhaB взаимодействует с АЦТ. Скорее всего, гемолитическая активность АЦТ *in vitro* реализуется после взаимодействия с филаментозным гемагглютинином на поверхности бактериальной клетки и доставки АЦТ в эукариотическую клетку [3].

Обращает на себя внимание факт отсутствия описанных инсерционных мутантов *bvgAS::IS481* или *bvgAS::IS1002* среди бактерий, выделенных от больных коклюшем, тогда как клинические изоляты, содержащие инсерции IS-элементов в генах *fhaB*, *prn* и участвующие в регуляции *katA* и *brkA*, описаны в литературе [16, 18, 20, 22]. В наших экспериментах такие мутантные бактерии *bvgAS::IS481* (1) были зарегистрированы в популяциях бактерий *B. pertussis*, персистирующих в организме реконвалесцентов коклюша и бессимптомных бактерионосителей. Можно предположить, что такое состояние возбудителя коклюша является оптимальным для персистенции в организме человека и выживания во внешней среде, а при попадании в восприимчивый организм происходят точное исключение IS-элемента (или инверсия), восстановление вирулентности бактерий, инфицирование организма и развитие заболевания. Похожую роль бактериям в состоянии пониженной вирулентности отводят M.R. Farman и соавт., изучившие профили транскрипции большой группы генов в бактериях *B. pertussis* внутри макрофагов [23]. Доказанное нами существование (накопление) инсерционных *Bvg*-мутантов *B. pertussis* на поздних стадиях инфекции указывает на регуляторную роль интеграций IS-элементов в формировании персистирующих бактерий в организме человека и, возможно, на их участие в передаче бактерий новому хозяину. Можно ожидать, что точное исключение IS-элемента из оперона вирулентности восстанавливает его структуру и способность бактерий вызывать заболевание. Остаются невыясненными механизмы и условия, вызывающие обычно редкие события точного исключения. Неясно также, на каком этапе персистенции или трансмиссии патогена оно происходит. Способность IS-элемента к точному исключению показана нами ранее на модели *Escherichia coli* [21, 24].

Неожиданными представляются результаты анализа *Hly*-мутантов *B. pertussis* Tohama I, зарегистрированных нами примерно в 95% проанализированных отдельных колоний, выращенных при расщепе одной из серий лиофилизированных культур из музея НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи. Среди 40 *Hly*-колоний не обнаружено мутантов *B. pertussis*, содержащих интеграции в специфической последовательности *NctagN* в генах *bvgAS*, *cya* и *fhaB*. В настоящее время мутации, ответственные за формирование генотипа выделенных нами *Hly*-клонов *B. pertussis* Tohama I, не установлены. Вполне вероятно, что они, как и 3 не установленные мутации *Hly*-клонов *B. pertussis* 4MKS, относятся к классу мутаций сдвига рамки считывания в гене *bvgS*, инсерциям в специфический сайт *bvg A* или содержат другие не идентифицированные нами нарушения в структуре оперона *bvgAS*, генов *fhaB* или *cya*.

Отсутствие интеграций в сайте *cctagg* оперона *bvgAS* проанализированных *Hly*-колоний на фоне их достоверной регистрации методом ПЦР в популяции перед её расщепом (до 4% интеграций *IS481* (1)) позволило предположить, что интеграции в соответствующем сайте могут присутствовать в геноме некоторых бактерий, сохранивших гемолитическую активность (с фенотипом *Hly*⁺). Действительно, среди бактерий фенотипа *Hly*⁺ были обнаружены 41,7% инсерционных мутантов, содержащих *IS481* (1) в опероне *bvgAS* при сохранении нативной последовательности оперона вокруг сайта интеграции. Учитывая проведённый выше анализ и ориентации *IS481*, можно ожидать, что эффективный промотор, обеспечивающий транскрипцию гена *bvgS* и *Hly*⁺-фенотип у инсерционных мутантов *B. pertussis*, расположен на конце элемента *IS481*, противоположном описанному Н. Нап и соавт. [18] и в работе S. Stibitz, показавшем дифференциальное снижение экспрессии генов *fhaB* и *ptx* и менее выраженные зоны гемолиза у КОЕ бактерий инсерционного мутанта *B. pertussis* [12].

Для более детальной характеристики мутанта *bvgAS::IS481* (1) *Hly*⁺-фенотипа нами запланировано сравнительное изучение токсической активности коклюшного и дермонекротического токсинов, титров агглютинации и электронно-микроскопический анализ морфологии и структуры бактерий *B. pertussis* Tohama I и их мутантного генотипа, биоинформационный анализ последовательности *IS481*, направленный на идентификацию и сравнение предполагаемых промоторов, расположенных на концах IS-элементов.

Таким образом, при культивировании *in vitro* бактерий *B. pertussis* в опероне *bvgAS* чаще других регистрируются интеграции *IS481* (1), которые ранее мы выявили в геномах бактерий *B. pertussis*, выделенных у реконвалесцентов коклюша и у экспериментальных животных. Прежние данные по анализу событий интеграции IS-элементов в одной ориентации (1) в значительной мере отражают динамику накопления всех инсерционных мутантов *bvgAS::IS* у бактерий *B. pertussis*.

Заключение

Полученные данные дают возможность сделать ряд значимых выводов, касающихся характеристик IS-элементов *B. pertussis*:

- IS-элементы способны перемещаться между специфическими сайтами на хромосоме *B. pertussis*, вызывая инактивацию генов или изменение регуляции их транскрипции при культивировании бактерий *in vitro*;
- частота перемещения IS-элементов и типы индуцируемых ими спонтанных мутаций зависят от генотипа и условий культивирования бактерий *B. pertussis*;

- факторы, влияющие на частоту перемещения IS-элементов, формирования спонтанных, инсерционных или иных мутантов, индуцированных IS-элементами, требуют дальнейшего изучения;
- в процессе культивирования и хранения бактерий *B. pertussis* могут возникать условия, индуцирующие формирование популяции гетерогенной по структуре генов вирулентности *fhaB*, *bvgAS* и, вероятно, других генов вирулентности бактерий;
- перемещение IS-элементов в специфический сайт межгенного пространства оперона *bvgAS* приводит к изменению регуляции генов вирулентности и других *bvg*-зависимых генов, возможно, обеспечивая длительную персистенцию бактерий *B. pertussis* в организме хозяина.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Vandamme P.A., Peeters C., Cnockaert M., et al. *Bordetella bronchialis* sp. nov., *Bordetella flabilis* sp. nov. and *Bordetella sputigena* sp. nov., isolated from human respiratory specimens, and reclassification of *Achromobacter sediminum* Zhang et al. 2014 as *Verticia sediminum* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2015;65(10):3674–82.
DOI: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000473>
2. Guiso N. Bordetella adenylate cyclase-hemolysin toxins. *Toxins (Basel)*. 2017;9(9):277.
DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins9090277>
3. Nash Z.M., Inatsuka C.S., Cotter P.A., et al. Bordetella filamentous hemagglutinin and adenylate cyclase toxin interactions on the bacterial surface are consistent with FhaB-mediated delivery of ACT to phagocytic cells. *mBio*. 2024;15(5):e0063224.
DOI: <https://doi.org/10.1128/mbio.00632-24>
4. Parkhill J., Sebahia M., Preston A., et al. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat. Genet.* 2003;35(1):32–40. DOI: <https://doi.org/10.1038/ng1227>
5. Weigand M.R., Peng Y., Loparev V., et al. The history of *Bordetella pertussis* genome evolution includes structural rearrangement. *J. Bacteriol.* 2017;199(8):e00806–16.
DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.00806-16>
6. Chen Q., Stibitz S. The BvgASR virulence regulon of *Bordetella pertussis*. *Curr. Opin. Microbiol.* 2019;47:74–81.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.01.002>
7. Boulanger A., Chen Q., Hinton D.M., et al. In vivo phosphorylation dynamics of the *Bordetella pertussis* virulence-controlling response regulator BvgA. *Mol. Microbiol.* 2013;88(1):156–72. DOI: <https://doi.org/10.1111/mmi.12177>
8. Belcher T., Dubois V., Rivera-Millot A., et al. Pathogenicity and virulence of *Bordetella pertussis* and its adaptation to its strictly human host. *Virulence*. 2021;12(1):2608–32.
DOI: <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1980987>
9. Weiss A.A., Falkow S. Genetic analysis of phase change in *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 1984;43(1):263–9.
DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.43.1.263-269.1984>
10. Stibitz S., Aaronson W., Monack D., et al. Phase variation in *Bordetella pertussis* by frameshift mutation in a gene for a novel two-component system. *Nature*. 1989;338(6212):266–9.
DOI: <https://doi.org/10.1038/338266a0>
11. Stibitz S. IS481 and IS1002 of *Bordetella pertussis* create a 6-base-pair duplication upon insertion at a consensus target site. *J. Bacteriol.* 1998;180(18):4963–6.
DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.180.18.4963-4966.1998>
12. Stibitz S. Mutations affecting the alpha subunit of *Bordetella pertussis* RNA polymerase suppress growth inhibition conferred by short C-terminal deletions of the response regulator BvgA. *J. Bacteriol.* 1998;180(9):2484–92.
DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.180.9.2484-2492.1998>
13. Нестерова Ю.В., Медкова А.Ю., Бабаченко И.В. и др. Клинико-диагностическое значение генетических маркеров *Bordetella pertussis* у контактных лиц в семейных очагах. *Журнал инфектологии*. 2019;11(1):17–24. Nesterova Yu.V., Medkova A.Yu., Babachenko I.V., et al. Clinical-diagnostic value of *Bordetella pertussis* genetic markers in contact persons in familial foci. *Journal Infectology*. 2019;11(1):17–24.
DOI: <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2019-11-1-17-24>
EDN: <https://elibrary.ru/ubtkhk>
14. Каратаев Г.И., Синяшина Л.Н., Медкова А.Ю. и др. Инсерционная инактивация оперона вирулентности в популяции персистирующих бактерий *Bordetella pertussis*. *Генетика*. 2016;52(4):422–30. Karataev G.I., Sinyashina L.N., Medkova A.Yu., et al. Insertional inactivation of virulence operon in population of persistent *Bordetella pertussis* bacteria. *Genetika*. 2016;52(4):422–30.
DOI: <https://doi.org/10.7868/S0016675816030085>
EDN: <https://elibrary.ru/vvgoit>
15. Weigand M.R., Pawloski L.C., Peng Y., et al. Screening and genomic characterization of filamentous hemagglutinin-deficient *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 2018;86(4):e00869–17.
DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.00869-17>
16. DeShazer D., Wood G.E., Friedman R.L. Molecular characterization of catalase from *Bordetella pertussis*: identification of the katA promoter in an upstream insertion sequence. *Mol. Microbiol.* 1994;14(1):123–30.
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb01272.x>
17. Ma L., Caulfield A., Dewan K.K., et al. Pertactin-deficient *Bordetella pertussis*, vaccine-driven evolution, and reemergence of pertussis. *Emerg. Infect. Dis.* 2021;27(6):1561–6.
DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2706.203850>
18. Han H.J., Kuwae A., Abe A., et al. Differential expression of type III effector BteA protein due to IS481 insertion in *Bordetella pertussis*. *PLoS One*. 2011;6(3):e17797.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017797>
19. Семин Е.Г., Синяшина Л.Н., Медкова А.Ю. и др. Конструирование рекомбинантных аттенуированных бактерий *Bordetella pertussis* генотипа ptxP3. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2018;95(4):33–41. Semin E.G., Sinyashina L.N., Medkova A.Y., et al. Construction of recombinant attenuated *Bordetella pertussis* bacteria of ptxP3 genotype. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2018;95(4):33–41.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-4-33-41>
EDN: <https://elibrary.ru/npsjcf>
20. Синяшина Л.Н., Воронцов В.В., Семин Е.Г. и др. Bvg-негативная регуляция перемещений повторяющихся последовательностей в клетках *B. pertussis*. *Генетика*. 2005;41(12):1–9.
EDN: <https://elibrary.ru/hswjwl> Sinyashina L.N., Vorontsov V.V., Semin E.G., et al. Bvg-negative regulation of repeated sequence transposition in *Bordetella pertussis* cells. *Russian Journal of Genetics*. 2005;41(12):1–9.
EDN: <https://elibrary.ru/ljjdgb>
21. Сивов И.Г., Большакова Т.Н., Каратаев Г.И. Интеграция и внутримолекулярное перемещение транспозона TnBp3 *B. pertussis* в клетках *E. coli* K-12, мутантных по белку Hpr фосфоенолпируват-зависимой фосфотрансферазной системы. *Генетика*. 2001;37(7):900–7. Sivov I.G., Bol'shakova T.N., Karataev G.I. Integration and intramolecular transposition of the TnBp3 transposon from *B. pertussis* in *E. coli* K-12 cells mutant for the Hpr protein of the phosphoenolpyruvate-

- dependent phosphotransferase system. *Russian Journal of Genetics*. 2001;37(7):900–7.
22. D'Halluin A., Petrácková D., Čurnová I., et al. An IS element-driven antisense RNA attenuates the expression of serotype 2 fimbriae and the cytotoxicity of *Bordetella pertussis*. *Emerg. Microbes Infect.* 2025;14(1):2451718. DOI: <https://doi.org/10.1080/22221751.2025.2451718>
 23. Farman M.R., Petrácková D., Kumar D., et al. Avirulent phenotype promotes *Bordetella pertussis* adaptation to the intramacrophage environment. *Emerg. Microbes Infect.* 2023;12(1):e2146536. DOI: <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2146536>
 24. Сивов И.Г., Каратаев Г.И., Белявский О.А. Интеграция плазмиды в хромосому *E. coli* K12, обусловленная транспозоном *Bordetella*. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2000;(2):33–6. Sivov I.G., Karataev G.I., Belyavsky O.A. Integration of a plasmid into the *E. coli* K12 chromosome mediated by a *Bordetella* transposon. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2000;(2):33–6.

Информация об авторах

Куликов Сергей Вячеславович — м. н. с. лаб. генетики бактерий отдела медицинской микробиологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, stromdang@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7478-3624>

Медкова Алиса Юрьевна — канд. мед. наук, с. н. с. лаб. генетики бактерий отдела медицинской микробиологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, baburida@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1509-0622>

Локтев Матвей Андреевич — лаборант-исследователь лаб. генетики бактерий НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, m_loktev00@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0002-5128-7681>

Синяшина Людмила Николаевна — д-р мед. наук, в. н. с. лаб. генетики бактерий отдела медицинской микробиологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, vasilissa7777@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1708-5453>

Каратаев Геннадий Иванович — д-р биол. наук, в. н. с., руководитель лаб. генетики бактерий отдела медицинской микробиологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, karataevgi@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8771-6092>

Участие авторов: Куликов С.В. — подготовка и проведение микробиологических и молекулярно-генетических исследований, анализ данных литературы и полученных экспериментальных данных, подготовка рукописи статьи; Медкова А.Ю. — проведение молекулярно-генетических исследований, анализ данных литературы и полученных экспериментальных данных, оформление и редактирование рукописи статьи, подготовка графического материала и таблиц; Локтев М.А. — проведение микробиологических и молекулярно-генетических исследований, работа с литературой; Синяшина Л.Н. — идея и концепция исследования, подготовка и проведение микробиологических исследований, анализ и обсуждение полученных результатов, рецензирование и редактирование рукописи; Каратаев Г.И. — руководство, идея, концепция, планирование исследования, анализ полученных результатов, сопоставление полученных данных с данными мировой литературы, рецензирование рукописи статьи, утверждение окончательного варианта для публикации. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 05.08.2025;
принята к публикации 14.10.2025;
опубликована 31.10.2025

Information about the authors

Sergey V. Kulikov — junior researcher, Laboratory of bacterial genetics, Department of medical microbiology, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, stromdang@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7478-3624>

Alisa Yu. Medkova — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of bacterial genetics, Department of medical microbiology, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, baburida@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1509-0622>

Matvej A. Loktev — research assistant, Laboratory of bacterial genetics, Department of medical microbiology, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, m_loktev00@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0002-5128-7681>

Lyudmila N. Sinyashina — Dr. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of bacterial genetics, Department of medical microbiology, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, vasilissa7777@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1708-5453>

Gennady I. Karataev — Dr. Sci. (Biol.), leading researcher, Head, Laboratory of bacterial genetics, Department of medical microbiology, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, karataevgi@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8771-6092>

Authors' contribution: Kulikov S.V. — preparation and conducting of microbiological and molecular genetic studies, analysis of literature data, analysis of experimental data, and preparation of the manuscript of an article; Medkova A.Yu. — conducting molecular genetic research, analyzing literature data and experimental data, formatting and editing the manuscript of the article, and preparing graphical material and tables; Loktev M.A. — conducting microbiological and molecular genetic research, and working with literature; Sinyashina L.N. — idea and concept of the study, preparation and conducting of microbiological research, analysis and discussion of the results obtained, review and editing of the manuscript; Karataev G.I. — management, idea, concept, research planning, analysis of the obtained results, comparison of the obtained data with the data from the world literature, review of the manuscript of the article, approval of the final version for publication. All of the authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a substantial contribution to the conception of the article, acquisition, analysis, interpretation of data for the article, drafting and revising the article, final approval of the version to be published.

The article was submitted 05.08.2025;
accepted for publication 14.10.2025;
published 31.10.2025



Мониторинг *Clostridioides difficile*-ассоциированной инфекции в условиях стационара

Господарик А.В.[✉], Прохорова Н.Д., Куликова В.К., Калачнюк Т.Н.,
Хромых Н.И., Кудрявцева Ю.В., Беспярых Ю.А.

Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина,
Москва, Россия

Аннотация

Введение. *Clostridioides difficile* — вид анаэробных спорообразующих грамположительных бактерий — является составной частью нормальной микрофлоры кишечника. *C. difficile*-ассоциированная инфекция развивается при избыточной колонизации *C. difficile*, вегетативные формы которой способны продуцировать экзотоксины, вызывающие воспаление в стенке толстой кишки. Токсигенные штаммы *C. difficile* являются основным возбудителем инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи в стационаре.

Целью исследования является изучение частоты выявления *C. difficile* (как токсигенных, так и нетоксигенных штаммов) у пациентов гастроэнтерологического отделения ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, госпитализированных в 2021–2023 гг. с синдромом диареи и другими установленными диагнозами.

Материалы и методы. В исследование были включены 547 пациентов в возрасте 19–88 лет (46,6% мужчин, 53,4% женщин). Для выявления ДНК *C. difficile* и генов её токсинов А и В применяли метод полимеразной цепной реакции в реальном времени, дополнительно проводили бактериологическое исследование кала. При обнаружении клинических признаков бактериальной инфекции проводили анализ на С-реактивный белок (СРБ).

Результаты. ДНК *C. difficile* выявлена у 65 (11,9%) пациентов, гены токсинов А и В обнаружены у 32 (5,9%) пациентов. Нетоксигенные штаммы *C. difficile* чаще детектировались у мужчин (55%) в возрасте до 40 лет. Токсигенные штаммы *C. difficile* с одинаковой частотой встречались у мужчин и женщин в возрасте до 40 лет. Анализ на СРБ показал, что воспалительные процессы чаще развиваются у пациентов старше 40 лет. Преобладающее заболевание с высоким показателем СРБ у пациентов с токсигенным штаммом — энтероколит, вызванный *C. difficile* (кодирование по МКБ-10: A04.7), в группе с нетоксигенным штаммом — у пациентов с диагнозом: язвенный колит (кодирование по МКБ-10: K51). У всех пациентов наблюдались выраженные нарушения баланса кишечной микрофлоры согласно развёрнутому бактериологическому анализу кала.

Заключение. В результате трёхлетнего мониторинга установлено увеличение доли пациентов с *C. difficile* с 6,6 до 7,9%. Доля образцов, положительных на гены токсинов А/В *C. difficile*, также увеличилась с 5,2 до 7,9%. Таким образом, необходимо проводить профилактические мероприятия для уменьшения влияния факторов риска развития *C. difficile*-ассоциированной инфекции в стационаре.

Ключевые слова: синдром диареи, *Clostridioides difficile*, трансплантация фекальной микрофлоры, эпидемиологический мониторинг в условиях стационара, микробиологический мониторинг в условиях стационара

Благодарность. Авторы выражают благодарность сотрудникам ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России: врачу КЛД ЦММИД В.Г. Кардашян и фельдшеру-лаборанту Е.С. Басич за помощь в сборе данных из лабораторной информационной системы.

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России (протокол № 2022/05/31 от 31.05.2022).

Источник финансирования. Работа по определению частоты встречаемости и лекарственной устойчивости выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-19-00788). Работа по выявлению корреляции основного заболевания и инфекции *C. difficile*, анализ сопутствующих биохимических маркеров, возможность носительства спор вне больницы выполнена в рамках государственного задания «Амальтея-1» (номер государственного учёта НИОКТР 124031500113-3).

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

Для цитирования: Господарик А.В., Прохорова Н.Д., Куликова В.К., Калачнюк Т.Н., Хромых Н.И., Кудрявцева Ю.В., Беспярых Ю.А. Мониторинг *Clostridioides difficile*-ассоциированной инфекции в условиях стационара. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2025;102(5):605–614.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-662>

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

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-662>

Monitoring for *Clostridioides difficile*-associated infection in hospital

Alina V. Gospodarik[✉], Natalya D. Prokhorova, Victoria K. Kulikova, Tatiana N. Kalachnuk, Nikolay I. Khromykh, Julia V. Kudriavtseva, Julia A. Bespyatykh

Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. *Clostridioides difficile* — an anaerobic, spore-forming, Gram-positive bacteria — is a component of the normal intestinal microflora. *C. difficile*-associated infection develops during its overcolonisation, when vegetative forms produce exotoxins that cause inflammation in the colon wall. Toxigenic strains of *C. difficile* are the main cause of healthcare-associated infections in hospitals.

The aim of the study is to investigate the frequency of detecting *C. difficile* (both toxigenic and non-toxigenic strains) in patients admitted to the gastroenterology department of the Yu.M. Lopukhin Federal Scientific Clinical Center for Physical and Chemical Medicine of the Federal Medical Biological Agency of Russia in 2021–2023 with diarrhea syndrome and other established diagnoses.

Materials and methods. The study included 547 patients aged 19–88 years (46.6% male, 53.4% female). Real-time polymerase chain reaction was used to detect *C. difficile* DNA and its toxin A and B genes, and a bacteriological examination of stool was also performed. Upon detection of clinical signs of bacterial infection, a C-reactive protein (CRP) test was performed.

Results. *C. difficile* DNA was detected in 65 (11.9%) patients, and toxins A and B genes were found in 32 (5.9%) patients. Non-toxigenic strains were more frequently detected in men (55%) under 40 years, while toxigenic strains were equally frequent in both sexes under 40. CRP analysis indicated that inflammatory processes were more likely in patients over 40 years old. The predominant diagnosis in toxigenic strain carriers with high CRP was *C. difficile*-associated enterocolitis (ICD-10: A04.7), whereas in the non-toxigenic group, it was ulcerative colitis (ICD-10: K51). Extended bacteriological analysis revealed significant gut microbiota imbalances in all patients.

Conclusion. Over the three-year surveillance period, the prevalence of *C. difficile*-positive patients increased from 6.6 to 7.9%, and the proportion of samples positive for toxin A/B genes rose from 5.2% to 7.9%. These findings underscore the necessity for enhanced preventive measures to mitigate risk factors for CDI in hospital settings. Therefore, preventive measures are necessary to reduce the impact of risk factors for the development of *C. difficile*-associated infection in hospitals.

Keywords: diarrhea syndrome, *Clostridioides difficile*, fecal microbiota transplantation, hospital epidemiological monitoring, hospital microbiological monitoring

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Local ethics committee of the Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine (protocol No. 2022/05/31, May 31, 2022).

Acknowledgement. The authors express their gratitude to the staff of the Yu.M. Lopukhin Federal Scientific Clinical Center of Physical and Chemical Medicine of the Federal Medical Biological Agency of Russia: Dr. V.G. Kardashyan of the Clinical Laboratory Diagnostics Department and Laboratory Technician E.S. Basich for their assistance in collecting data from the laboratory information system.

Funding source. The work to determine the frequency of occurrence and drug resistance was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (project No. 23-19-00788). Work to identify the correlation of the underlying disease and clostridial infection, analysis of associated biochemical markers, and the possibility of spore carriage outside the hospital was carried out within the framework of the state task "Amalthea-1" (state registration number R&D 124031500113-3).

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

For citation: Gospodarik A.V., Prokhorova N.D., Kulikova V.K., Kalachnuk T.N., Khromykh N.I., Kudriavtseva J.V., Bespyatykh J.A. Monitoring for *Clostridioides difficile*-associated infection in hospital. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(5):605–614.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-662>

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

Введение

Обеспечение безопасной среды для пациентов и медицинских работников, а также контроль качества медицинской помощи являются приоритетными задачами в деятельности медицинских

учреждений. Особую важность приобретает задача снижения заболеваемости и смертности, связанных с внутрибольничными инфекциями. Одним из ключевых факторов, способствующих снижению риска возникновения инфекций, связанных с оказанием

медицинской помощи (ИСМП), является создание эффективной системы эпидемиологического мониторинга. Такая система позволяет своевременно выявлять наличие инфекционных заболеваний как у пациентов, так и у медицинских работников, что значительно повышает безопасность и качество медицинской помощи. Кроме того, профилактические меры, направленные на снижение ИСМП, могут способствовать снижению социальных рисков и вероятности страховых случаев для пациентов и медицинских работников¹.

Возбудителями ИСМП являются разнообразные микроорганизмы, простейшие, гельминты, вирусы и прионы. Среди них наиболее распространены токсигенные штаммы *Clostridioides difficile*. Факторы, способствующие развитию инфекции *C. difficile*, многочисленны. Основным из них является использование антибактериальной терапии для лечения пациентов и связанное с этим изменение микрофлоры желудочно-кишечного тракта. Наибольший риск связан с применением антибактериальных препаратов из группы пенициллинов, цефалоспоринов, фторхинолонов и клиндамицина. Кроме того, факторами риска развития инфекции *C. difficile* являются возраст старше 65 лет, использование ингибиторов протонной помпы в схемах лечения, коморбидность. Механизм передачи *C. difficile*-ассоциированной инфекции — фекально-оральный, осуществляется контактно-бытовым путём (через контаминированные руки медицинского персонала, используемое медицинское оборудование и поверхности в помещениях стационара, с которыми соприкасается пациент). *C. difficile* является частью нормальной микрофлоры кишечника. Носителями спор *C. difficile* могут быть как пациенты, так и сотрудники медицинских организаций. Образование вегетативных форм может быть связано с индивидуальными особенностями организма (пациента или медицинского работника), нарушением состава кишечной микрофлоры, её индивидуальной стабильностью, а также со снижением количества представителей типов *Firmicutes* и *Bacteroides*.

Развитие клинической картины инфекции *C. difficile* обусловлено патогенными свойствами вегетативных форм, которые способны продуцировать экзотоксины: энтеротоксин А, цитотоксин В и бинарный токсин CDT. Некоторые штаммы *C. difficile* могут продуцировать токсины А и В, другие — только токсин А или бинарный токсин, реже — только токсин В. Наличие высокого титра антитоксических антител и колонизационная ре-

зистентность нормальной кишечной микрофлоры обеспечивают возможность клинически бессимптомных форм заболевания.

Этиологическая идентификация возбудителя *C. difficile*-ассоциированной инфекции актуальна при наличии клинических форм заболевания. Лабораторная диагностика *C. difficile* должна проводиться несколькими способами для повышения диагностической точности. В России в соответствии с клиническими рекомендациями², а также с учётом клинических рекомендаций ACG [1] для проведения диагностики инфекции *C. difficile* рекомендован трёхэтапный алгоритм лабораторного подтверждения:

1. Бактериологическим методом осуществляют выделение токсигенной культуры *C. difficile* и определяют её чувствительность к антибактериальным препаратам.

2. Серологическими методами (иммунохроматографический анализ, иммуоферментный анализ) и методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в просветных фекалиях определяют содержание глутаматдегидрогеназы.

3. Серологическими методами и методом ПЦР в просветных фекалиях определяют содержание токсинов А и В [2].

Золотым стандартом для установления этиологии заболевания считается бактериологический метод выделения чистой культуры и определение её цитотоксичности на культуре клеток. Однако определение токсинообразования выделенных штаммов *C. difficile* с помощью теста на выделенной культуре клеток обременительно для практических лабораторий в медицинских организациях, хотя обладает высокой чувствительностью и специфичностью. Кроме того, обнаружение чистой культуры *C. difficile* у пациентов с признаками острой кишечной инфекции не проводится, не включено в стандарты оказания медицинской помощи при кишечных инфекциях неустановленной этиологии, что существенно затрудняет своевременное установление диагноза при возникновении синдрома диареи в стационарных условиях в течение 48 ч от начала госпитализации или установления связи клинического эпизода диареи с нахождением в стационаре в последние 4 нед до него. Данные случаи возникновения заболевания должны быть расценены как ИСМП в случае как экзогенного, так и эндогенного инфицирования [3, 4].

Наиболее широко в лабораториях многопрофильных стационаров в России используется имму-

¹ Методические рекомендации «Эпидемиологическая диагностика инфекционных болезней, связанных с оказанием медицинской помощи, на основе стандартных определений случая». 2024. URL: https://nasci.confreg.org/libs/files/mr_sos.pdf (дата обращения: 08.06.2025).

² Клинические рекомендации «Клостридиальная инфекция: диагностика, лечение и профилактика». 2022. URL: <https://www.rnmot.ru/public/uploads/RNMOT/clinical/2022/ФИНАЛЬНЫЕ%20КЛИНИЧЕСКИЕ%20РЕКОМЕНДАЦИИ%20Клостридиальная%20инфекция%209112022.pdf> (дата обращения: 08.06.2025).

ноферментный анализ с определением токсинов А и В *C. difficile* в кале.

ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР) является высокочувствительным и приоритетным методом в связи с быстрым получением результата, используется в лабораторной диагностике в медицинских организациях, имеющих возможность проведения ПЦР, и предназначен для одновременного выявления и идентификации ДНК *C. difficile* + токсин А + токсин В в биологическом материале (кал). Комбинация метода ПЦР с другими методами позволяет повысить прогностическую ценность положительного результата [5].

Цель исследования — изучение частоты выявления *C. difficile* (как токсигенных, так и нетоксигенных штаммов) у пациентов гастроэнтерологического отделения многопрофильного стационара.

Материалы и методы

В гастроэнтерологическом отделении многопрофильного стационара ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина с 01.01.2021 по 31.12.2023 проведено ретроспективное наблюдательное открытое описательное исследование.

Объекты (участники) исследования

В исследование включены 547 человек обоих полов в возрасте 19–88 лет, из них 255 (46,6%) мужчин, 292 (53,4%) женщины. Средний койко-день пребывания пациентов в стационаре составил 9,44 сут.

Критерии включения в исследование: пациенты мужского и женского пола в возрасте 18–89 лет на момент включения в исследование, госпитализированные в гастроэнтерологическое отделение, имеющие клинические признаки синдрома диареи, с различными нозологическими группами, включая синдром раздражённого кишечника (кодирование по МКБ-10: K58), воспалительные заболевания кишечника: язвенный колит (K51), болезнь Крона (K50), энтероколит, вызванный *C. difficile* (A04.7), псевдомембранозный колит (K52.8) и мегаколон (K59.3).

Критерии неключения в исследование: пациенты с диареей без установленного диагноза; наличие признаков психических и поведенческих расстройств, не позволяющих осуществить сбор жалоб и анамнеза; иммунодефицитные состояния, в том числе ВИЧ-инфекция, трансплантация костного мозга или внутреннего органа или первичный иммунодефицит; сопутствующее заболевание, требующее госпитализации и/или хирургического вмешательства, или заболевание, которое считается угрожающим жизни, в течение 30 дней до и/или на момент включения в исследование по оценке исследователя; наличие в анамнезе тяжёлой алкогольной, лекарственной или наркотической зависимости.

Исследование проводилось при добровольном информированном письменном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России (протокол № 2022/05/31 от 31.05.2022).

Всем пациентам, включённым в исследование, было выполнено бактериологическое исследование кала, определение в кале ДНК *C. difficile* и генов, кодирующих токсины А и В (*tcdA*, *tcdB*), методом ПЦР. У пациентов с клиническими признаками бактериальной кишечной инфекции (сохранение фебрильной лихорадки на фоне проводимого лечения лихорадки более 3 сут, лейкоцитоз с наличием нейтрофильного сдвига лейкоцитарной формулы, появлением патологических примесей в стуле — крови, слизи) дополнительно было выполнено исследование крови на С-реактивный белок (СРБ).

Анализ кала на ДНК *C. difficile* и определение генов токсинов А и В

Для обеспечения стандартизации биоматериала (кал) для исследования на *C. difficile* забирали в первые 24 ч после поступления пациента в гастроэнтерологическое отделение стационара. Экстракцию ДНК из кала выполняли с использованием набора реагентов для выделения нуклеиновых кислот «НК-СОРБЕНТ» (НПФ «Литех»). До проведения ПЦР выделенная ДНК хранилась при –20°C.

Выявление и дифференциацию ДНК *C. difficile* и генов токсинов А и В выполняли с использованием набора реагентов «Флуороплекс *Clostridioides difficile* + Toxin A + Toxin B» (НПФ «Литех») методом РВ-ПЦР на амплификаторе «CFX96» («Bio-Rad Laboratories»). Для контроля качества выделения ДНК, а также предотвращения возникновения ложноотрицательных результатов в наборе использовался внутренний экзогенный контроль (детектируемый по каналу HEX), который вносится в исследуемые образцы на этапе экстракции ДНК. РВ-ПЦР проводили в следующем режиме: 80°C — 2 мин, 95°C — 1 мин 30 с, затем 40 циклов: 95°C — 15 с, 60°C — 30 с, 72°C — 40 с. Всего было протестировано 547 образцов ДНК.

Бактериологический посев кала

Анализ проводили согласно методическим рекомендациям «Бактериологическая диагностика дисбактериоза» (утв. 14.04.1977) и ОСТ 91500.11.0004-2003 «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника». Один грамм нативного образца кала гомогенизировали в 9 мл физиологического раствора (1/10), оставляли при комнатной температуре на 10–15 мин. Из исходного разведения (10¹) готовили ряд последующих разведений до 10⁸. Далее полученную суспензию высевали на пи-

тательные среды для культивирования различных групп микроорганизмов.

Бактериологический анализ оценивали:

- через 20–22 ч на средах Эндо, кровяной агар, SS- и XLD-агар;
- через 48 ч на средах Сабуро, желточно-солевой агар и молочно-ингибиторной;
- через 72 ч на средах Блаурокк, МРС-2, железосульфитный агар.

Статистический анализ

Размер выборки предварительно не рассчитывали. Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программы «SPSS Statistics v. 27» («IBM»). Для анализа оценки распространённости токсигенных и нетоксигенных штаммов использовали такие показатели, как частота выявленной заболеваемости и структура заболеваемости (удельный вес). Количественные показатели оценивали на предмет соответствия нормальному распределению. Частоту встречаемости признака в группе описывали в виде процентного содержания. Для представления данных использовали методы описательной статистики (абсолютные значения, проценты). Ввиду описательного характера анализа динамики показателей мониторинга за 2021–2023 гг. расчёт статистической значимости различий не проводили.

Результаты

Основные результаты исследования

В проведённом нами исследовании по результатам РВ-ПЦР ДНК *C. difficile* была выявлена у 65 пациентов (34 — мужского пола, 31 — женского), что составило 11,9%, при этом гены токсинов А и В обнаружены у 32 (5,9%) пациентов. Нетоксигенные штаммы *C. difficile* преимущественно обнаружены у мужчин (55%) в возрасте до 40 лет. Токсигенные штаммы *C. difficile* (несущие гены токсинов А и В) с одинаковой частотой встречались у мужчин и женщин в возрасте до 40 лет.

Анализ частоты встречаемости инфекции в 2021–2023 гг. показал рост количества пациентов с

C. difficile с 6,6 до 7,9%. Частота обнаружения токсигенных штаммов *C. difficile* также увеличилась с 5,2 до 7,9% (таблица).

Соотношение частоты различных заболеваний среди пациентов с установленной инфекцией *C. difficile* представлено на рисунке.

Нетоксигенные штаммы *C. difficile* ($n = 33$) выявлены в группе пациентов с энтероколитом, вызванным *C. difficile*, у 7 (21,2%) пациентов с болезнью Крона, 5 (15,2%) пациентов с язвенным колитом, 4 (12,1%) пациентов с синдромом раздражённого кишечника. В 10 (30,3%) случаях нетоксигенные штаммы *C. difficile* были выявлены у пациентов с различными заболеваниями желудочно-кишечного тракта, включая язвенный колит, хронический панкреатит, стеатогепатит, язву желудка и др.

Токсигенные штаммы *C. difficile* ($n = 32$) выявлены у 17 (53,1%) пациентов с установленным диагнозом энтероколита, вызванного *C. difficile*, 5 (15,6%) пациентов с болезнью Крона, у 4 (12,5%) пациентов с язвенным колитом. Также токсигенные штаммы *C. difficile* были выявлены у 6 (18,8%) пациентов с язвенными поражениями отделов толстого кишечника.

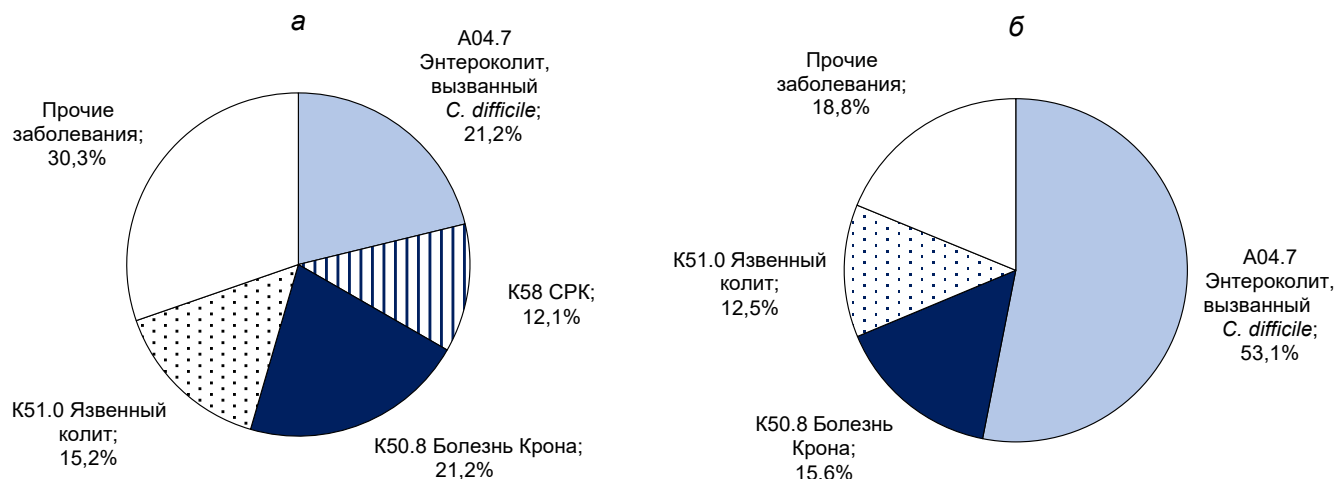
Биохимические показатели крови

Биохимическое исследование крови на СРБ было выполнено 49 из 65 пациентов, у которых выявлены штаммы *C. difficile*. СРБ выше нормальных показателей (0–5 мг/л) диагностирован у 22 пациентов (группа с токсигенными штаммами *C. difficile* — 11 человек, из них 8 мужчин и 3 женщины; группа с нетоксигенными штаммами *C. difficile* — 11 человек, из них 6 мужчин и 5 женщин) и находится в пределах 6,53–240,9 мг/л. Высокий уровень СРБ наблюдался у пациентов мужского пола: преобладающее заболевание (45%) — среди пациентов (мужчин) с токсигенным штаммом — энтероколит, вызванный *C. difficile* (5 из 11 человек в возрасте старше 40 лет), в группе с нетоксигенными штаммами наибольшее количество мужчин (36,4%) имели диагноз язвенный колит (4 из 11 человек в возрасте 40–60 лет). Данные результаты свиде-

Выявляемость токсигенных и нетоксигенных штаммов *C. difficile* у пациентов в период наблюдения 2021–2023 гг. (на 547 обследованных)

Анализ	2021 г.		2022 г.		2023 г.		Итого пациентов
	количество пациентов	%	количество пациентов	%	количество пациентов	%	
Выявлены нетоксигенные штаммы <i>C. difficile</i>	14	6,6	6*	3,5	13	7,9	33
Выявлены токсигенные штаммы <i>C. difficile</i> (токсины А и В)	11*	5,2	8	4,7	13	7,9	32
Не обнаружены штаммы <i>C. difficile</i>	186	88,2	157	91,8	139	84,2	482
Всего пациентов	211		171		165		547

Примечание. *Один пациент госпитализирован дважды: первый раз — в 2021 г., затем независимо второй раз в 2022 г.



Распределение подтверждённых диагнозов в группе пациентов с диагностированными нетоксигенными (а) и токсигенными (б) штаммами *C. difficile*.

тельствуют о том, что воспалительный процесс чаще развивается у пациентов старше 40 лет при различных формах колитов.

Бактериологический анализ кала

Развёрнутый бактериологический анализ на дисбиоз кишечника по клиническим показаниям был выполнен 36 (55,4%) пациентам с положительным ПЦР-анализом на *C. difficile*. У всех пациентов наблюдались выраженные нарушения баланса микрофлоры кишечника (нормофлоры): снижение облигатно-анаэробной микрофлоры (рода бифидо- и лактобактерий в ряде случаев снижены значительно), сдвиг соотношения лактозопозитивных и лактозонегативных кишечных палочек в сторону последних, появления гемолитически активной кишечной палочки, снижение общего количества энтерококков. В ходе микробиологического исследования обсеменённость сульфитредуцирующими анаэробами рода клостридий выявлена выше нормы ($\leq 10^6$) у 20 (55,6%) пациентов. У 18 (50%) пациентов выявлена повышенная обсеменённость условно-патогенной микрофлорой, в том числе *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Acinetobacter* spp., *Staphylococcus aureus*. При этом у 13 (36%) пациентов обнаружена повышенная представленность грибов рода *Candida*, что свидетельствует о нарушениях баланса кишечной микрофлоры, вызванных в том числе антибиотикотерапией.

Лечение *C. difficile*-ассоциированной инфекции в стационаре

Из 65 пациентов гастроэнтерологического отделения, включённых в исследование, у которых была выявлена ДНК *C. difficile*, 24 (36,9%) в качестве препарата 1-й линии антибактериальной терапии был назначен ванкомицин в дозировке 1 г/сут перорально в течение 10–14 дней. Из пациентов,

получающих данную схему терапии, 18 имели токсигенные штаммы *C. difficile*, 6 — нетоксигенные.

Для лечения рецидивирующей инфекции *C. difficile* 6 пациентам (4 женщины и 2 мужчин в возрасте до 60 лет) с диагнозом «энтероколит, вызванный *C. difficile*», была выполнена трансплантация фекальной микробиоты (ТФМ) в терминальный отдел двенадцатиперстной кишки через инструментальный канал эндоскопа.

Повторные обращения (рецидивы заболевания)

Повторная госпитализация пациентов, включённых в микробиологический мониторинг в 2021–2023 гг., с выявленной ДНК *C. difficile* зафиксирована у 9 (13,8% — 6 женщин и 3 мужчин) из 65 наблюдаемых. Среди них у 5 пациентов первично выявлены нетоксигенные штаммы *C. difficile*, у 4 — токсигенные. Повторное обращение в стационар было у пациентов с болезнью Крона (3 пациента с нетоксигенными штаммами, 1 — с токсигенным), язвенным колитом (2 пациента с нетоксигенными штаммами, 2 — с токсигенными), энтероколитом, вызванным токсигенным штаммом (1 пациент).

Обсуждение

Обобщение результатов исследования

Включение в исследование пациентов гастроэнтерологического отделения с синдромом диареи позволило нам сформировать выборку лиц с признаками активной инфекции *C. difficile*. Выбранная нами тактика согласуется с международным опытом тестирования на инфекцию *C. difficile* в стационаре. Так, по мнению ACG, необходимо тестировать лиц с указанием в анамнезе на 3 или более неоформленных стула в течение 24 ч, в том числе с высоким индексом коморбидности (пациентов онкологических, гематологических отделений и отделений транс-

плантологии), а также пациентов с признаками кишечной непроходимости [6, 7]. Результаты проведённого нами исследования свидетельствуют об увеличении числа случаев регистрации инфекции *C. difficile* в гастроэнтерологическом отделении стационара в 2021–2023 гг. с 6,6 до 7,9%, в том числе доля образцов, положительных на гены токсинов А и В *C. difficile*, увеличилась с 5,2 до 7,9%. Увеличение числа случаев регистрации инфекции *C. difficile* в 2021–2023 гг. может быть обусловлено пандемией новой коронавирусной инфекции. В исследовании Т. Zuo и соавт. сделан вывод о неблагоприятном воздействии течения коронавирусной инфекции на микрофлору кишечника, снижении колонизационной резистентности против *C. difficile* [8].

Особые опасения вызывает включение *C. difficile* в группу ESKAPE-патогенов и способность формировать госпитальные штаммы (клоны). Кроме заболеваний, напрямую связанных с *C. difficile*, таких как энтероколит, вызванный *C. difficile*, псевдомембранозный колит и мегаколон, существуют и другие нозологии, при которых присоединение инфекции *C. difficile* может служить отягчающим фактором, например, болезнь Крона, язвенный колит [9]. Таким образом, актуальным является эпидемиологический и микробиологический мониторинг встречаемости *C. difficile* у пациентов гастроэнтерологического отделения как с признаками синдрома диареи, так и при наличии факторов риска. Развитие инфекции *C. difficile* у пациентов может быть связано с эндогенными причинами (развитие клинических признаков заболевания у бессимптомных носителей при избыточной колонизации *C. difficile* и продукции токсинов), а также с оказанием медицинской помощи [10]. М. Sartelli и соавт. сообщают, что за последние 20 лет наблюдается рост внебольничных случаев инфекции (до 25–28% случаев *C. difficile*-ассоциированной инфекции) [11].

Выявление токсигенных и нетоксигенных штаммов

Являясь частью нормальной микрофлоры кишечника, *C. difficile* может не вызывать заболевание. В нашем исследовании, поскольку все пациенты имели синдром диареи, выявление исключительно нетоксигенных штаммов *C. difficile* (без генов токсинов) интерпретировалось как свидетельство того, что текущий эпизод диареи, вероятно, не связан с *C. difficile*, а вызван иными причинами (другими инфекционными агентами, обострением основного заболевания, лекарственными воздействиями и др.). Обнаружение нетоксигенных штаммов не всегда ассоциировано с наличием инфекционного заболевания, но имеются сведения о бессимптомном носительстве *C. difficile* как предрасполагающем факторе к развитию клинически развёрнутой ин-

фекции *C. difficile* [12]. Выявлены географические различия частоты бессимптомного носительства *C. difficile* у взрослых госпитализированных пациентов от 4,4 до 23,2% [13]. Обнаружение токсигенных штаммов *C. difficile* у поступивших пациентов связано с почти в 6 раз более высоким риском развития клинически развернутой инфекции. Частота обнаружения токсигенных штаммов *C. difficile* у госпитализированных в стационар в многоцентровом исследовании I.M. Zacharioudakis и соавт. составила 8,1% [14]. В проведённом нами исследовании частота обнаружения токсигенных штаммов *C. difficile* в гастроэнтерологическом отделении многопрофильного стационара в 2023 г. составила 7,9%.

Исследование уровня СРБ

Использование стандартных лабораторных тестов в диагностике инфекции *C. difficile* и определении степени её тяжести, таких как маркеры системного воспалительного ответа, включая СРБ, позволяет определить группу пациентов с возможным развитием тяжёлого течения и неблагоприятным прогнозом.

Бактериологический анализ кала

В исследование нами были включены пациенты со взрослым состоянием микрофлоры кишечника, что предполагает наличие у неё основных характеристик: разнообразия, устойчивости, способности достигать стабильности. Сообщается о значительном снижении разнообразия и устойчивости кишечной микрофлоры при инфекции *C. difficile*, а также снижении количества представителей облигатной микробиоты (*Firmicutes*, *Bacteroidetes* и *Actinobacteria*) [15, 16]. Кроме того, отмечено преобладание количества протеобактерий (особенно *Enterobacteriaceae*). По результатам бактериологического исследования кала в нашем исследовании отмечено наличие дисбаланса кишечной микрофлоры, в том числе преобладание количества *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Acinetobacter* spp., *Staphylococcus aureus*.

Лечение *C. difficile*-ассоциированной инфекции в стационаре

Выбор антиклостридиальной терапии согласно российским клиническим рекомендациям осуществляется в соответствии со степенью тяжести заболевания. Для лечения первого нетяжёлого эпизода у пациентов с благоприятным прогнозом (молодой возраст пациента, отсутствие признаков иммунодефицитного состояния и хронических заболеваний) может быть использован метронидазол в дозе 500 мг 3 раза в день в течение 10 дней. Для лечения первого нетяжёлого эпизода инфекции *C. difficile* у других групп пациентов рекомендуется использо-

вать ванкомицин в дозе 250 мг 4 раза в день в течение 10 дней.

ТФМ имеет все ещё низкий уровень достоверности доказательств и слабый уровень убедительности рекомендаций, но рекомендована к применению при тяжёлой и фульминантной формах инфекции *C. difficile*, резистентной к стандартной антибактериальной терапии. Имеющиеся результаты обсервационных исследований позволяют использовать алгоритмы ТФМ [17]. Так, в случае тяжёлого или фульминантного течения инфекции, рефрактерного к терапии ванкомицином в комбинации с внутривенным введением метронидазола в течение 5 дней, пациенту показана ТФМ с использованием видеоколоноскопии. Результаты рандомизированного клинического исследования, выполненного G. Ianiro и соавт., свидетельствуют об эффективном использовании данного алгоритма в комбинации с 14-дневным курсом ванкомицина, что позволило достигнуть излечения в 75% случаев при проведении даже одного курса ТФМ и в 100% случаев — при выполнении нескольких процедур ТФМ [18]. Однако проведение ТФМ возможно при наличии доступа к банку замороженных образцов фекальной микробиоты.

В нашем исследовании 24 (36,9%) из 65 пациентов гастроэнтерологического отделения, включённых в исследование, у которых была выявлена ДНК *C. difficile*, проведена антибактериальная терапия ванкомицином в дозировке 1 г/сут перорально. При отсутствии положительной клинико-лабораторной динамики для лечения рецидивирующей инфекции *C. difficile* 6 пациентам была выполнена ТФМ. Клинический эффект достигнут у всех пациентов, повторных обращений в отделение стационара не регистрировалось. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что метод ТФМ является крайне перспективным для лечения инфекций *C. difficile*, что согласуется в том числе с данными литературы [19–21].

Заключение

В результате трёхлетнего мониторинга установлено увеличение доли пациентов с *C. difficile* с 6,6 до 7,9%. Доля образцов, положительных на гены токсинов А/В *C. difficile*, также увеличилась с 5,2 до 7,9%. Таким образом, необходимо проводить профилактические мероприятия для уменьшения влияния факторов риска развития инфекции *C. difficile*-ассоциированной инфекции в стационаре.

Выявление инфекции *C. difficile* среди пациентов различных нозологических групп свидетельствует о необходимости проведения исследования на инфекцию *C. difficile* всем пациентам с синдромом диареи. Для повышения диагностической точности и установления окончательного этиологического диагноза диареи необходимо использовать комби-

нацию методов идентификации. Единственный диагностический метод, который можно использовать без комбинации с другими методами, — это ПЦР, который на сегодня является самым высокочувствительным и приоритетным методом диагностики инфекции *C. difficile*. Включение ПЦР в клинические рекомендации по инфекции *C. difficile* и критерии качества по оказанию медицинской помощи больным с инфекцией *C. difficile* будет способствовать своевременному установлению клинического диагноза, точному применению и выбору схем антиклостридиальной терапии, снижению общей заболеваемости и смертности от ИСМП в стационаре.

Отдельным вопросом эпидемиологического и микробиологического мониторинга в медицинской организации остаётся мониторинг за отсутствием признаков заболевания или латентной инфекции у медицинских работников, осуществляющих профессиональную деятельность, а также за объектами внешней среды (аппаратура для диагностики и лечения, зонды для кормления и др.), которые могут быть контаминированы *C. difficile*, что особенно актуально для гастроэнтерологических отделений и будет учтено в первую очередь при планировании наших дальнейших, более детальных исследований в области эпидемиологии и профилактики инфекции *C. difficile* в стационаре.

Исключение факторов риска *C. difficile*-ассоциированной инфекции, в первую очередь разумное применение схем антибактериальной терапии в лечении пациентов, является главным профилактическим мероприятием, а основным способом профилактики рецидивов — поддержка диспозиционных свойств пациента, в частности, повышение колонизационной резистентности кишечника.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Kelly C.R., Fischer M., Allegretti J.R., et al. ACG clinical guidelines: prevention, diagnosis, and treatment of *Clostridioides difficile* infections. *Am. J. Gastroenterol.* 2021;116(6): 1124–47. DOI: <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000001278>
2. Khuvis J., Alsoubani M., Mae Rodday A., Doron S. The impact of diagnostic stewardship interventions on *Clostridioides difficile* test ordering practices and results. *Clin. Biochem.* 2023;117: 23–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2022.03.009>
3. Solanky D., Juang D.K., Johns S.T., et al. Using diagnostic stewardship to reduce rates, healthcare expenditures and accurately identify cases of hospital-onset *Clostridioides difficile* infection. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2021;42(1):51–6. DOI: <https://doi.org/10.1017/ice.2020.375>
4. Doll M., Marra A.R., Apisarnthanarak A., et al. Prevention of *Clostridioides difficile* in hospitals: a position paper of the International Society for Infectious Diseases. *Int. J. Infect. Dis.* 2021;102:188–95. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.10.039>
5. Johnson S., Laverne V., Skinner A.M., et al. Clinical practice guideline by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA): 2021 focused update guidelines on management of *Clostridioides difficile* infection in adults. *Clin. Infect. Dis.*

- 2021;73(5):e1029–44.
DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciab549>
6. Kelly C.R., Fischer M., Allegretti J.R., et al. ACG clinical guidelines: prevention, diagnosis, and treatment of *Clostridioides difficile* infections. *Am. J. Gastroenterol.* 2021;116(6):1124–47. DOI: <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000001278>
7. Захаренко С.М. *Clostridioides difficile*: название новое, проблемы диагностики и терапии прежние. *Альманах клинической медицины.* 2022;50(6):377–91. Zakharenko S.M. *Clostridioides difficile* – a new name, the old problems with diagnosis and treatment. *Almanac of Clinical Medicine.* 2022;50(6):377–91. DOI: <https://doi.org/10.18786/2072-0505-2022-50-048> EDN: <https://elibrary.ru/dqvpmmx>
8. Zuo T. et al. Alterations in gut microbiota of patients with COVID-19 during time of hospitalization. *Gastroenterology.* 2020;159(3):944–55.e8. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.05.048>
9. Zaver H.B., Moktan V.P., Harper E.P., et al. Reduction in health care facility-onset *Clostridioides difficile* infection: a quality improvement initiative. *Mayo Clin. Proc. Innov. Qual. Outcomes.* 2021;5(6):1066–74. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mayocpiqo.2021.09.004>
10. Волчкова Е.В., Белоусова Е.А., Макачук П.А. и др. Частота выявления инфекции *Clostridium difficile* в больничных условиях. *Альманах клинической медицины.* 2014;(33):71–6. Volchkova E.V., Belousova E.A., Makarchuk P.A., et al. Frequency of detection of *Clostridium difficile* infection in hospital conditions. *Almanac of Clinical Medicine.* 2014;(33):71–6. EDN: <https://elibrary.ru/sxyjwn>
11. Sartelli M., Di Bella S., McFarland L.V., et al. 2019 update of the WSES guidelines for management of *Clostridioides (Clostridium) difficile* infection in surgical patients. *World J. Emerg. Surg.* 2019;14:8. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13017-019-0228-3>
12. Solbach P., Chhatwal P., Woltemate S., et al. Microbiota-associated risk factors for *Clostridioides difficile* acquisition in hospitalized patients: a prospective, multicentric study. *Clin. Infect. Dis.* 2021;73(9):e2625–34. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa871>
13. Hung Y.P., Lee J.C., Lin H.J., et al. Clinical impact of *Clostridium difficile* colonization. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2015;48(3):241–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2014.04.011>
14. Zacharioudakis I.M., Zervou F.N., Pliakos E.E., et al. Colonization with toxinogenic *C. difficile* upon hospital admission, and risk of infection: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* 2015;110(3):381–90. DOI: <https://doi.org/10.1038/ajg.2015.22>
15. Amrane S., Hocquart M., Afouda P., et al. Metagenomic and culturomic analysis of gut microbiota dysbiosis during *Clostridium difficile* infection. *Sci. Rep.* 2019;9(1):12807. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49189-8>
16. Magne F., Gotteland M., Gauthier L., et al. The firmicutes/bacteroidetes ratio: a relevant marker of gut dysbiosis in obese patients? *Nutrients.* 2020;12(5):1474. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu12051474>
17. Fischer M., Kao D., Kassam Z., et al. Stool donor body mass index does not affect recipient weight after a single fecal microbiota transplantation for *Clostridium difficile* infection. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2018;16(8):1351–3. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2017.12.007>
18. Ianiro G., Masucci L., Quaranta G., et al. Randomised clinical trial: faecal microbiota transplantation by colonoscopy plus vancomycin for the treatment of severe refractory *Clostridium difficile* infection—single versus multiple infusions. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2018;48(2):152–9. DOI: <https://doi.org/10.1111/apt.14816>
19. Акиншина А.И., Смирнова Д.В., Загайнова А.В. и др. Перспективы использования методов коррекции микробиоты при терапии воспалительных заболеваний кишечника. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.* 2019;29(2):12–22. Akinshina A.I., Smirnova D.V., Zagaynova A.V., et al. Prospects of using microbiota correction methods in the treatment of inflammatory bowel disease. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology.* 2019;29(2):12–22. DOI: <https://doi.org/10.22416/1382-4376-2019-29-2-12-22> EDN: <https://elibrary.ru/zgxuip>
20. Щербakov П.Л., Белова Н.Д., Генерозов Э.В. и др. Применение фекальной трансплантации в лечении заболеваний пищеварительного тракта (первый клинический опыт). *Доктор.Ру.* 2019;(3):40–6. Scherbakov P.L., Belova N.D., Generezov E.V., et al. Faecal transplant in gut treatment (pilot clinical experience). *Doctor.Ru.* 2019;(3):40–6. DOI: <https://doi.org/10.31550/1727-2378-2019-158-3-40-46> EDN: <https://elibrary.ru/bsrtjsj>
21. Woodworth M.H., Carpentieri C., Sitchenko K.L., Kraft C.S. Challenges in fecal donor selection and screening for fecal microbiota transplantation: a review. *Gut Microbes.* 2017;8(3):225–37. DOI: <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1286006>

Информация об авторах

Господарик Алина Владимировна[✉] — канд. биол. наук, н. с. Центра молекулярной медицины и диагностики ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина, Москва, Россия, alina.gospodaryk@rcpcm.org, <https://orcid.org/0009-0003-7870-1106>

Прохорова Наталья Дмитриевна — м. н. с. Центра молекулярной медицины и диагностики ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина, Москва, Россия, yfnecz510@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6485-1056>

Куликова Виктория Кирилловна — лаборант-исследователь Центра молекулярной медицины и диагностики ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина, Москва, Россия, v.k.kulikova@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0002-7592-9108>

Калачнюк Татьяна Николаевна — канд. мед. наук, зав. отд. гастроэнтерологии ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина, Москва, Россия, ktn-25@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0002-6953-6818>

Хромых Николай Иванович — биолог Центра молекулярной медицины и диагностики ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина, Москва, Россия, khromykh.nikolya@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0001-6806-3548>

Information about the authors

Alina V. Gospodaryk[✉] — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Center for molecular medicine and diagnostics, Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia, alina.gospodaryk@rcpcm.org, <https://orcid.org/0009-0003-7870-1106>

Natalya D. Prokhorova — junior researcher, Center for molecular medicine and diagnostics, Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia, yfnecz510@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6485-1056>

Victoria K. Kulikova — laboratory researcher, Center for molecular medicine and diagnostics, Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia, v.k.kulikova@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0002-7592-9108>

Tatiana N. Kalachnuck — Cand. Sci. (Med.), Head, Department of gastroenterology Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia, ktn-25@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0002-6953-6818>

Nikolay I. Khromykh — biologist, Center for molecular medicine and diagnostics, Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia, khromykh.nikolya@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0001-6806-3548>

Кудрявцева Юлия Витальевна — лаборант-исследователь Центра молекулярной медицины и диагностики ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина, Москва, Россия, vitolga10@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0001-6713-5140>

Беспярых Юлия Андреевна — канд. биол. наук, доцент, зав. лаб. молекулярной медицины, рук. Центра молекулярной медицины и диагностики ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина, Москва, Россия, juliabes@rcpcm.org, <https://orcid.org/0000-0002-4408-503X>

Вклад авторов: *Господарик А.В., Прохорова Н.Д.* — анализ клинических данных, написание текста рукописи, обзор публикаций по теме статьи; *Куликова В.К.* — анализ результатов, *Калачнюк Т.Н.* — клиническое ведение пациентов с назначением и контролем лечения; *Хромых Н.И.* — анализ данных по бактериологическому исследованию кала пациентов; *Кудрявцева Ю.В.* — формирование метаданных; *Беспярых Ю.А.* — концепция исследования, финальное редактирование текста рукописи. Авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

Статья поступила в редакцию 22.07.2025;
принята к публикации 01.10.2025;
опубликована 31.10.2025

Julia V. Kudriavtseva — laboratory researcher, Center for molecular medicine and diagnostics, Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia, vitolga10@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0001-6713-5140>

Julia A. Bespyatykh — Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor; Head, Laboratory of molecular medicine, Head, Center for molecular medicine and diagnostics, Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia, juliabes@rcpcm.org, <https://orcid.org/0000-0002-4408-503X>

Author contribution: *Gospodarik A.V., Prokhorova N.D.* — clinical data analysis, manuscript writing, literature review; *Kulikova V.K.* — clinical data analysis; *Kalachnuck T.N.* — clinical management of patients with prescription and monitoring of treatment, *Khromykh N.I.* — analysis of data on bacteriological examination of patient stool; *Kudryavtseva J.V.* — metadata formation; *Bespyatykh J.A.* — study concept, final manuscript editing. The authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

The article was submitted 22.07.2025;
accepted for publication 01.10.2025;
published 31.10.2025



Совершенствование схемы MLVA-типирования штаммов *Burkholderia mallei*

Леденева М.Л.[✉], Бондарева О.С., Ткаченко Г.А., Устинов Д.В., Захарова И.Б.

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт, Волгоград, Россия

Аннотация

Введение. Регистрация на территории России отдельных случаев сапа у лошадей, возбудителем которого является *Burkholderia mallei*, определяет важность разработки алгоритмов генотипирования этого патогена. Перспективным остается метод MLVA (multilocus-variable tandem repeat analysis), основанный на сравнительном анализе количества варьируемых тандемных повторов (VNTR — variable number tandem repeats). По мере увеличения числа полногеномных последовательностей в международных базах данных изменяется информативная ценность VNTR-локусов, что требует пересмотра существующих схем типирования.

Цель работы — оценить перспективность включения VNTR-локуса BPSS1974[#] в схему MLVA-6 для внутривидовой дифференциации *B. mallei*.

Материалы и методы. Исследование 64 штаммов *B. mallei* проводили *in silico* и *in vitro* с помощью методов MLVA, амплификации дифференцирующих регионов, полногеномного секвенирования и биоинформатического анализа.

Результаты. Генотипирование *B. mallei* при использовании схемы MLVA-6 не позволило определить *in silico* VNTR-профили 13 штаммов из базы данных GenBank NCBI по одному или нескольким локусам ввиду низкого покрытия ридов соответствующих областей генома или их полного отсутствия (нуль-аллели). Эффективное число аллелей (ne) и индекс полиморфного информационного содержания (PIC) для локусов схемы MLVA-6 варьировали в диапазонах 3,842–8,103 и 0,740–0,877 соответственно. Перспективность включения в эту схему VNTR-локуса BPSS1974[#] определена на основе молекулярной стабильности мотива в его составе и высоких показателей ne и PIC, составивших 4,299 и 0,767 соответственно. VNTR-профили коллекционных штаммов по локусу BPSS1974[#] были идентичны соответствующим штаммам из базы данных GenBank. Результаты кластерного анализа при сочетанном использовании схемы MLVA-6 и локуса BPSS1974[#] соответствовали филогенетическим реконструкциям, полученным с использованием других молекулярно-генетических методов.

Заключение. VNTR-локус BPSS1974[#] можно расценивать как маркер, включение которого в схему MLVA-6 позволит повысить точность генотипирования и установления регионов происхождения вновь выделенных штаммов *B. mallei*.

Ключевые слова: *Burkholderia mallei*, сап, генотипирование, MLVA, тандемные повторы

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: Леденева М.Л., Бондарева О.С., Ткаченко Г.А., Устинов Д.В., Захарова И.Б. Совершенствование схемы MLVA-типирования штаммов *Burkholderia mallei*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2025;102(5):615–625.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-720>

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

Original Study Article
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-720>

Improvement of the MLVA typing scheme for *Burkholderia mallei* strains

Margarita L. Ledenyova[✉], Olga S. Bondareva, Galina A. Tkachenko, Dimitriy V. Ustinov, Irina B. Zakharova

Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russia

Abstract

Introduction. The registration of sporadic cases of glanders in horses in Russia, caused by *Burkholderia mallei*, highlights the importance of developing genotyping algorithms for this pathogen. The MLVA method (multilocus-variable tandem repeat analysis), based on a comparative analysis of the number of variable tandem repeats (VNTRs), remains a promising genotyping tool. As the number of whole-genome sequences in international databases increases, the informative value of VNTR loci changes, necessitating a revisiting of existing typing schemes.

The aim of this study was to assess the feasibility of including the VNTR locus BPSS1974[#] in the MLVA-6 scheme for intraspecies differentiation of *B. mallei*.

Materials and methods. The study of 64 strains of *B. mallei* was conducted *in silico* and *in vitro* using MLVA, differentiating region amplification, whole-genome sequencing, and bioinformatic analysis.

Results. Genotyping *B. mallei* using the MLVA-6 scheme failed to determine *in silico* VNTR profiles of 13 strains from the GenBank NCBI database for one or more loci due to low read coverage of the corresponding genomic regions or their complete absence (null alleles). The effective number of alleles (ne) and the polymorphic information content (PIC) index for the MLVA-6 scheme loci ranged from 3.842–8.103 and 0.740–0.877, respectively. The potential for including the VNTR locus BPSS1974[#] in this scheme was determined based on the molecular stability of the motif within it and a high values for ne and PIC, which were 4.299 and 0.767, respectively. VNTR profiles of the collection strains at locus BPSS1974[#] were identical to the corresponding strains in the GenBank database. The results of the cluster analysis using a combined MLVA-6 scheme and the BPSS1974[#] locus were consistent with the phylogenetic reconstructions obtained using other molecular genetic methods.

Conclusion. The VNTR locus BPSS1974[#] can be considered a marker, the inclusion of which in the MLVA-6 scheme will improve the accuracy of genotyping and the determination of the regions of origin of newly isolated *B. mallei* strains.

Keywords: *Burkholderia mallei*, glanders, genotyping, MLVA, tandem repeats

Funding source. The authors declare that there was no external funding for the study.

Conflict of interest. The authors declare the absence of any explicit or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Ledeneva M.L., Bondareva O.S., Tkachenko G.A., Ustinov D.V., Zakharova I.B. Improvement of the MLVA typing scheme for *Burkholderia mallei* strains. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2025;102(5):615–625.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-720>

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

Введение

Грамотрицательная бактерия *Burkholderia mallei* является возбудителем сапа — потенциально смертельного антропозооноза, поражающего в основном непарнокопытных животных: лошадей, мулов и ослов [1, 2]. Заболевание людей связано с их профессиональной деятельностью и возникает при тесном контакте с инфицированными животными, например, у зоотехнических и ветеринарных работников [3]. Известны случаи заражения сотрудников бактериологических лабораторий, проводящих работы с культурами *B. mallei* [4, 5]. В России возбудитель сапа относят к микроорганизмам II группы патогенности, а за рубежом — к потенциальным агентам биотерроризма группы В, что обусловлено возможностью возникновения чрезвычайной ситуации в области общественного здравоохранения при использовании *B. mallei* в качестве биологического оружия [6–8].

В настоящее время вспышки или случаи сапа происходят спорадически в ряде регионов Азии и Ближнего Востока, Северной Африки, а также Центральной и Южной Америки [9, 10]. Регистрация завозных случаев сапа у животных в странах, свободных от этого заболевания, создаёт угрозу зара-

жения местного поголовья скота, людей и возможность реинтродукции инфекции [11, 12].

Случаи сапа регистрируют в сопредельных с Россией странах, что требует настороженности ветеринарных служб в отношении данного заболевания, особенно в регионах Сибири и Дальнего Востока. Вспышка сапа в 2023 г. среди лошадей на территории Читинской государственной заводской конюшни с ипподромом им. Хосаена Хакимова, зарегистрированная Всемирной организацией здравоохранения животных¹, свидетельствует о важности эпидемиологического мониторинга сапа на территории России.

Современные методы внутривидового типирования позволяют получать подробную генетическую характеристику возбудителя для решения таких задач, как расследование случаев заболевания людей или животных, определение эволюционных и филогенетических связей штаммов микроорганизма [13–15]. Однако в случае сапа поиск эффективных ДНК-мишеней осложняется высокой консер-

¹ Russia — *Burkholderia mallei* (Inf. with) (Glanders) — Follow up report 1 [FINAL]. URL: <https://wahis.woah.org/#/in-review/4915>

вативностью генома *B. mallei*. Высокая плотность микро- и мини-сателлитных повторов (Variable Number Tandem Repeats, VNTRs) в геноме возбудителя сапа определяет перспективность применения схем дифференциации штаммов на основе мультилокусного анализа числа вариабельных тандемных повторов (Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis, MLVA). В зарубежных источниках с этой целью наиболее часто используют схему из 23 VNTR-локусов, первоначально предложенную для возбудителя мелиоидоза — *B. pseudomallei*, клоном которого, как предполагается, является возбудитель сапа [16]. Однако эта схема не оптимизирована для возбудителя сапа. Большое количество локусов типирования повышает общую стоимость анализа.

Для снижения трудоёмкости и себестоимости метода MLVA актуальной является разработка сокращённых схем, позволяющих при использовании меньшего числа локусов сохранять дискриминирующую силу и достоверность молекулярно-эпидемиологических исследований. Подобранный нами ранее комбинация из 6 VNTR-локусов позволяла дифференцировать штаммы *B. mallei* с высокой дискриминирующей силой [17]. Вместе с тем информативная ценность VNTR-локусов изменяется по мере увеличения количества новых полногеномных последовательностей в международных базах данных, что требует пересмотра существующих схем типирования.

В недавней работе нами была показана перспективность применения схемы из 5 VNTR- и 4 SNP-локусов для установления географических регионов происхождения штаммов *B. pseudomallei* и определения клональности изолятов при выявлении случаев мелиоидоза [18]. Предложенный в этом исследовании новый VNTR-локус BPSS1974^{#1}, расположенный в участке гена *BPS_RS29560*, характеризовался стабильностью амплификации и наличием ампликонов у всех исследуемых штаммов возбудителя мелиоидоза. Последовательность тандемного повтора (мотива) состояла из 9 пар нуклеотидов и имела вырожденную структуру, которая находилась под действием стабилизирующего отбора. Присутствие в геноме возбудителя сапа ортогологичного гена определяет возможность использования локуса BPSS1974^{#1} для совершенствования 6-локусной схемы MLVA-типирования *B. mallei*.

Цель исследования — оценить перспективность включения VNTR-локуса BPSS1974^{#1} в схему MLVA-6 для генетического типирования штаммов *B. mallei*.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись полногеномные последовательности 56 штаммов возбу-

дителя сапа из базы данных GenBank NCBI². Сформированная нами выборка включала нуклеотидные последовательности штаммов *B. mallei*, изолированных в эндемичных странах (Индия, Пакистан, Бразилия), некоторых частях Азии и Ближнего Востока, где вспышки или случаи происходят спорадически (Турция, Китай, Мьянма, Бахрейн), а также в США и ряде европейских стран (Венгрия, Югославия).

Для оценки стабильности ДНК-локусов в составе генотипирующих систем использовали 7 штаммов *B. mallei* из коллекции Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора. Коллекционным штаммам P-1, Muksuwar-11, B-120, Ц-4 и Ц-5 соответствовали дубликаты штаммов, депонированные в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур под номерами SCPM-O-B-4688, SCPM-O-B-7093, SCPM-O-B-7146, SCPM-O-B-4682 и SCPM-O-B-4683. В свою очередь коллекционным штаммам Muksuwar-11, Bogor-37 и Zagreb соответствовали штаммы, нуклеотидные последовательности которых депонированы в GenBank NCBI под номерами GCA_033870375.1, GCA_033870395.1 и GCA_033870355.1. Также в исследование включён коллекционный штамм *B. mallei* 16050, изолированный от лошади в 2023 г. в период вспышки сапа на государственной конюшне в Чите. Нуклеотидные последовательности геномов коллекционных штаммов депонированы в Российскую платформу агрегации информации о геномах возбудителей инфекционных и паразитарных заболеваний «VGARus» (Virus Genome Aggregator of Russia). Всего в исследовании проанализировано 64 штамма возбудителя сапа.

Для постановки полимеразных цепных реакций (ПЦР) при проведении MLVA-типирования и амплификации дифференцирующих регионов генома (Different Region Analysis, DFR) ДНК выделяли с помощью набора реагентов «РИБО-преп» (ЦНИИ Эпидемиологии). Полногеномную ДНК для проведения секвенирования выделяли с помощью набора «Биолабмикс-DU-250» («Биолабмикс») согласно инструкции производителя.

Праймеры и параметры амплификации при типировании с использованием схемы MLVA-6 и локуса BPSS1974^{#1} описаны нами ранее [17, 18]. VNTR-профиль штаммов определяли как совокупность аллельных вариантов по каждому локусу и представляли в виде числового паттерна количества повторов в схеме «L933k/L3145k/L3652k/L20k/L1217k/S2862k/BPSS1974^{#1}».

DFR-генотипы определяли методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени по 9 фрагментам:

² URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>

BmVAT1, BmVAT2, BmVAT3, BmVAT4, BmVAT5, BmVAT6, BmVAT7, BmVAT8, BmVAT9, используя последовательности олигонуклеотидов и схему генотипирования, описанные О.С. Бондаревой и соавт. [19]. Результаты DFR-типирования конвертировали в двоичную матрицу, в которой наличие ампликона обозначалось «1», а его отсутствие — «0».

Приготовление библиотек для полногеномного секвенирования осуществляли с помощью набора реагентов «Nextera XT library prep kit», секвенирование проводили на платформе «MiSeq» с использованием набора «MiSeq Reagent Kit v3» (все — «Illumina Inc.»). Исходные нуклеотидные прочтения (риды) обработаны с помощью утилиты Trimmomatic со стандартными параметрами для «Illumina». Обработанные риды собирали с помощью SPAdes v3.15.4 с использованием опции «--isolate» и стандартными параметрами командной строки [20].

Кластерный анализ и построение дендрограмм проводили с использованием программ FAMD v. 1.31 [21] и Mega v. 11.0.11 [22] при помощи алгоритма объединения ближайших соседей и коэффициента генетической дистанции Жаккарда. Для оценки дискриминирующей способности схем типирования использовали индекс Хантера–Гастона (Hunter Gaston discriminatory index, HGDI) [23]. При анализе информативности мини-сателлитных локусов определяли количество аллелей, эффективное число аллелей (ne) и индекс полиморфного информационного содержания (PIC).

Результаты

Анализ *in silico* показал, что в геноме референтного штамма *B. mallei* ATCC 23344 (GCA_033956065.1) весь ампликон локуса BPSS1974^{#1} размером 692 пары нуклеотидов (п. н.) в положении 1627686–1628377 приходился на ген *BMA_RS16575* длиной 1755 п. н., расположенный на второй хромосоме. Как и в геноме *B. pseudomallei*, ген *BMA_RS16575* аннотирован в базе данных GenBank NCBI как коллагеноподобный белок, содержащий повтор тройной спирали (WPJ46631.1, 584 п. н.). Сайт для прямого праймера занимал положения 1627686–1627707 в геноме *B. mallei* ATCC 23344 и 28–49 в последовательности гена *BMA_RS16575*, для обратного праймера — положения 1628359–1628377 и 701–719 соответственно. Как и в геноме возбудителя мелиоидоза, 3-, 6- и 9-я позиции мотива в составе локуса BPSS1974^{#1} находились под действием стабилизирующего отбора.

При типировании *in silico* 56 штаммов *B. mallei* из базы данных GenBank NCBI с использованием праймеров к локусу BPSS1974^{#1} выявлены 10 аллельных вариантов, наиболее распространёнными из которых являлись повторы с копийностью 56 и 54 — на их долю приходилось по 17 штаммов.

По 55 и 53 повтора имели 9 и 5 штаммов соответственно, для 2 штаммов количество повторов составило 58, остальные 5 вариантов были уникальными. У *B. mallei* SCPM-O-B-4686 места посадки праймеров отсутствовали (нуль-аллель).

С использованием схемы MLVA-6 нуль-аллели выявлены по локусу L1217k у 14 штаммов из базы данных GenBank NCBI. Анализ молекулярной природы нуль-аллелей показал, что отсутствие продуктов амплификации по локусам BPSS1974^{#1} и L1217k обусловлено делецией соответствующих фрагментов генома. Нуль-аллели по локусу L1217k, выявленные в 4 полных геномах штаммов *B. mallei* 6, 34, BMQ и 23344, учтены в дальнейшей работе как одни из аллельных вариантов. Однако геномы штаммов *B. mallei* BM-1, BM-5, BM-6, Turkey5, NCTC 3709, SCPM-O-B-4682, SCPM-O-B-4683, SCPM-O-B-4684, SCPM-O-B-4688 и SCPM-O-B-4686 представлены набором контигов разной длины, что не исключает отсутствие ПЦР-продукта при анализе *in silico* по причине неполной нуклеотидной последовательности. Поэтому в дальнейшем эти штаммы были исключены из анализа.

Применение схемы MLVA-6 не позволило определить *in silico* генотипы штаммов *B. mallei* BM-1, BM-3, BM-6 и BM-9 по локусу L20k и *B. mallei* 3076 по локусу L3652k, поскольку целевая VNTR-область оказалась локализованной на разных контигах. В связи с этим данные штаммы также были удалены из исследования.

Исключение 13 штаммов из выборки привело к потере 3 уникальных аллельных вариантов по локусу BPSS1974^{#1} и одного — по локусу L20k. В табл. 1 представлены штаммы *B. mallei*, которые в дальнейшем были использованы при проведении кластерного анализа.

В результате амплификации VNTR-локусов у коллекционных штаммов *B. mallei* получены ПЦР-продукты, представляющие на электрофореграмме единичные полосы. При этом продукт амплификации по локусу L1217k отсутствовал у 3 штаммов из коллекции (*B. mallei* P-1, Ц-4 и Ц-5). Последующее секвенирование ампликонов позволило установить соответствующее число повторов для каждого локуса. В дальнейшем при расчёте показателей полиморфизма VNTR-локусов проводили совместный учёт MLVA-профилей штаммов из GenBank NCBI и коллекции Волгоградского научно-исследовательского противочумного института (табл. 1).

При расчёте эффективного числа аллелей (ne) и индекса полиморфного информационного содержания (PIC) для локуса BPSS1974^{#1} установлены значения 4,299 и 0,767 соответственно. В скорректированной выборке штаммов количество аллелей по локусам схемы MLVA-6 было распределено следующим образом: минимальное число в локусах

Таблица 1. Результаты MLVA- и DFR-типирования штаммов *B. mallei*

Название штамма <i>B. mallei</i> (номер в GenBank или VGARus)	Место; год выделения	MLVA-профиль*	Номер MLVA- профиля/ кластера**	DFR- тип***
6 (GCA_000755845.1)	Турция; 1950	14/7/8/4,86/-/7/50	1/A	17
Ц-4 (vnip002737)****	Монголия; 1967	11/7/6/17/-/8/54	2/A	06
Ц-5 (vnip002738)****	Монголия; 1967	11/7/6/17/-/8/54	2/A	06
BMQ (GCA_000755885.1)	Индия; 1932	2/4/7/9/-/5/54	1/B	12
23344 (GCA_000755865.1)	Мьянма; 1944	2/4/7/29/-/5/54	2/B	12
NCTC 3708 (GCA_003590195.1)	Индия; 1932	2/6/10/5/7,9/10/55	1/C	24
16050 (vnip002404)****	Россия, Чита; 2023	5/6/11/17/5/10/54	2/C	06
mongolia_1	Монголия; 2022	9/5/16/17/5/6/55	3/C	06
B-120 (vnip002736)****	Россия, Улан-Удэ; 1985	10/6/8/17/5/6/55	4/C	06
SCPM-O-B-7146 (GCA_003627695.1)	Россия, Улан-Удэ; 1985	10/6/8/17/5/6/55	4/C	06
BM-2 (GCA_028621615.1)	Китай, Хэбэй; нет данных	6/8/10/19/4,9/6/55	1/D	16
2002721277 (GCA_003590185.1)	США; 1956	10/8/7/17/4,9/12/55	2/D	16
China5 (GCA_000757315.2)	Китай; 1956	10/8/8/16/4,9/10,4/55	3/D	16
2000031063 (GCA_000756025.2)	Венгрия; нет данных	10/8/8/16/4,9/12/55	4/D	16
P-1 (vnip002735)****	Югославия; нет данных	6/5/11/7/-/6/55	1/E	09
SAVP1 (GCA_000015465.1)	Индия; нет данных	4/5/9/7/9,9/11/55	2/E	04
2000031066 (GCA_003590125.1)	Индия; нет данных	4/5/7/7/13,9/12/54	3/E	21
NCTC 10247 (GCA_000762285.1)	Турция, Анкара; 1960	5/9/12/7/4,9/7/54	1/F	03
34 (GCA_939576165.1)	Нет данных; 1972	10/9/16/7/-/6/54	2/F	20
Bahrain1 (GCA_001729545.1)	Бахрейн; 2011	2/10/14/15/5,9/6/54	1/G1	22
BM-4 (GCA_028621665.1)	Китай, Хэбэй; нет данных	6/10/10/18/8/13/54	1/G2	23
11 (GCA_000959405.1)	Турция; 1949	8/10/10/8/4,9/3/54	2/G2	19
NCTC 10229 (GCA_000015605.1)	Венгрия, Будапешт; 1961	10/10/14/9/4,9/8/54	1/G3	02
2002734299 (GCA_000959165.1)	Венгрия; 1961	10/11/14/9/4,9/8/54	2/G3	02
Ivan (GCA_000986905.1)	Венгрия; 1961	10/10/13/9/4,9/8/54	3/G3	02
BM_campo 2.1 (GCA_905359435.1)	Бразилия; 2016	10/10/13/9/4,9/8/54	3/G3	02
UFAL2 (GCA_905359425.1)	Бразилия; 2017	8/4/9/14/4,9/4/27	1/H	06
PRL-20 (GCA_000169875.1)	Пакистан, Лахор; 2005	5/4/6/6/3,9/7/58	1/I	25
India86-567-2 (GCA_000959465.1)	Индия; нет данных	6/4/8/6/8,9/11/58	2/I	01
Turkey1 (GCA_002345985.1)	Турция; нет данных	7/4/11/6/6,9/7/56	1/J	15
Turkey2 (GCA_002346025.1)	Турция; нет данных	7/4/10/6/6,9/7/56	2/J	15
Turkey3 (GCA_002346065.1)	Турция; нет данных	7/4/7/6/6,9/6/56	3/J	15
Turkey4 (GCA_002346085.1)	Турция; 1960	7/4/11/6/6,9/6/56	4/J	15
Turkey6 (GCA_002346125.1)	Турция; нет данных	7/4/11/6/6,9/6/56	4/J	15
Turkey7 (GCA_002346145.1)	Турция; нет данных	7/4/11/6/6,9/7/56	1/J	15
Turkey8 (GCA_002346165.1)	Турция; нет данных	7/4/11/6/6,9/7/56	1/J	15
Turkey9 (GCA_002346185.1)	Турция; нет данных	7/4/12/6/6,9/7/56	5/J	15
Turkey10 (GCA_002346005.1)	Турция; нет данных	7/4/11/6/6,9/7/56	1/J	15
Muksuwar-11 (vnip002733)****	Индия; 1979	5/4/8/17/6,9/12/53	1/K	11
SCPM-O-B-7093 (GCA_003627585.1)	Индия; 1979	5/4/8/17/6,9/11/53	2/K	07
Mukteswar (GCA_033870375.1)	Индия; 1996	5/4/8/17/6,9/11/53	2/K	11
Zagreb (vnip002734)****	Югославия; нет данных	5/4/8/15/6,9/6/53	3/K	07
Bogor-37 (vnip002732)****	Индонезия; 1979	5/4/8/15/6,9/11/53	4/K	07
Zagreb (GCA_033870355.1)	Югославия; 1996	5/4/8/15/6,9/11/53	4/K	07
Bogor (GCA_033870395.1)	Индонезия; 1995	5/4/8/15/6,9/11/53	4/K	07

Окончание табл. 1.

Название штамма <i>B. mallei</i> (номер в GenBank или VGARus)	Место; год выделения	MLVA-профиль*	Номер MLVA- профиля/ кластера**	DFR- тип***
Kweiyang#4 (GCA_001608335.1)	Китай; 1942	9/7/4/24,71/6,9/15/56	1/L	22
2002721274 (GCA_002522985.1)	США; 1956	9/7/4/19/6,9/16/56	2/L	01
ATCC 23344 (GCA_033956065.1)	Мьянма; 1942	8/7/4/31/6,9/15/56	3/L	01
JHU (GCA_002346205.1)	США, Мэриленд; 2000	8/7/4/27/6,9/15/56	4/L	01
FMH 23344 (GCA_000755785.1)	Мьянма; 1944	8/7/4/27/6,9/15/56	4/L	01
FMH (GCA_002346045.1)	США, Мэриленд; 2000	8/7/4/27/6,9/15/56	4/L	01

Примечание. *MLVA-профиль штаммов записан в виде числового паттерна количества повторов в схеме «L933k/L3145k/L3652k/L20k/L1217k/S2862k/BPSS1974^{#1}».

**Каждому MLVA-профилю присвоен порядковый номер внутри соответствующего кластера, сформированного при построении дендрограммы.

***Номера DFR-типам присвоены в соответствии с ранее опубликованными данными [19].

****Штаммы из коллекции Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора.

L3145k (ne = 4,257; PIC = 0,765) и L933k (ne = 7,087; PIC = 0,859) — 8 и 10 аллелей соответственно, в локусах L3652k (ne = 7,368; PIC = 0,864) и L1217k (ne = 3,842; PIC = 0,74) — по 11 аллелей, в локусе S2862k (ne = 7,628; PIC = 0,869) — 13 аллелей, максимальное число в локусе L20k (ne = 8,103; PIC = 0,877) — 16 аллелей. HGDI при добавлении локуса BPSS1974^{#1} к схеме MLVA-6 не изменился и составил 0,981.

Для анализа генетического полиморфизма штаммов, VNTR-профили которых были достоверно определены, дополнительно использовали метод амплификации дифференцирующих регионов генома. В результате 51 штамм возбудителя сапа был распределён по 19 DFR-типам, из которых 6 выявлены впервые (DFR20 — 001110011, DFR21 — 000111110, DFR22 — 111110110, DFR23 — 110110111, DFR24 — 010111010, DFR25 — 111101100).

При сравнении дендрограмм, построенных на основании результатов типирования с использованием схемы MLVA-6 (рисунк, а), и при включении в эту схему локуса BPSS1974^{#1} (рисунк, б) наблюдали отличия во взаиморасположении прикорневых кластеров и отдельных штаммов. Так, при сочетании использования схемы MLVA-6 и локуса BPSS1974^{#1} сформирован новый кластер, обозначенный нами как G и состоящий из подкластеров G1, G2 и G3. Подкластер G1 сформировал штамм *B. mallei* Bahrain1. Подкластер G2 включал штаммы BM-4 и *B. mallei* 11, а подкластер G3 — штаммы *B. mallei* NCTC 10229, 2002734299 и Ivan, выделенные сотрудниками Печского института в Венгрии в 1961 г., и *B. mallei* BM_campo 2.1. Для штаммов подкластера G3 установлен общий DFR-тип (DFR02), а их MLVA-профили отличались на 1 повтор по локусам L3145k и L3652k, при этом VNTR-генотипы штаммов BM_campo 2.1 и Ivan полностью идентичны.

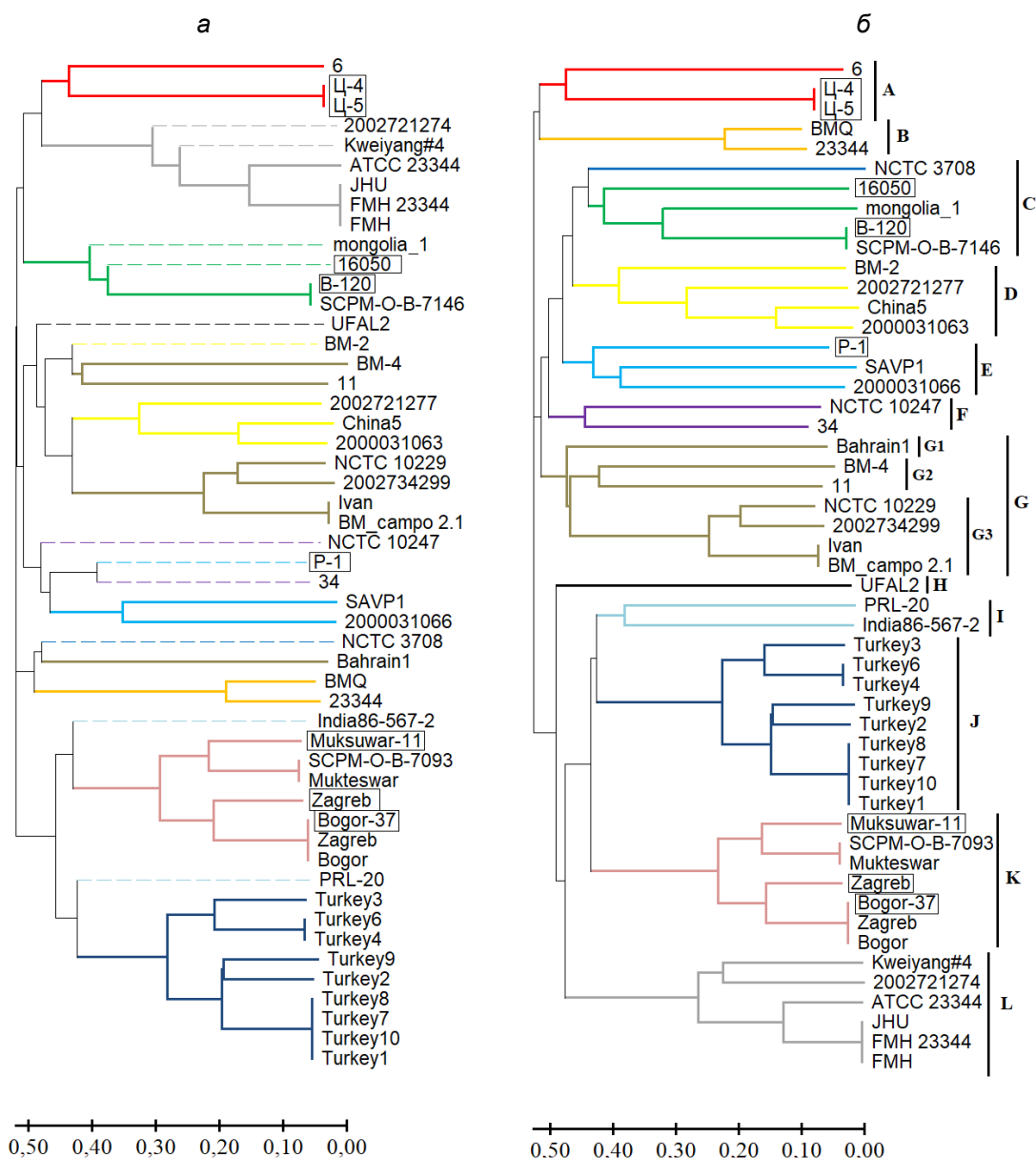
На соседних ветвях дендрограммы расположены штаммы из кластеров F и E. Для штаммов из кластера F — *B. mallei* 34 неизвестного проис-

хождения и NCTC 10247 — определено одинаковое число повторов по VNTR-локусам L3145k, L20k и BPSS1974^{#1}, а их DFR-профили были уникальны и отличались по локусам BmVAT1 и BmVAT6. В кластер E вошли штаммы из Индии (2000031066 и SAVP1) с идентичным MLVA-профилем по локусам L933k, L3145k и L20k, при этом их DFR-типы также являлись уникальными и отличались отсутствием локуса BmVAT6 у *B. mallei* SAVP1. Отдельную ветвь в составе кластера E сформировал штамм *B. mallei* P-1 из Югославии.

Включение локуса BPSS1974^{#1} в схему типирования позволило расположить штамм *B. mallei* BM-2 в виде отдельной ветви в составе кластера D, состоящего из штаммов *B. mallei* 2002721277, China5 и 2000031063. У всех штаммов этого кластера установлено одинаковое число повторов по локусам L3145k, L1217k и BPSS1974^{#1}, а также идентичный DFR-профиль (DFR16).

Генотип по локусу BPSS1974^{#1}, соответствующий 58 повторам, был выявлен только у индийского штамма *B. mallei* India86-567-2 и PRL-20, что позволило выделить эти штаммы в отдельный кластер I. Штамм India86-567-2 принадлежал к типу DFR01, а PRL-20 — к впервые выявленному нами типу DFR25, который отличался от DFR01 отсутствием локусов BmVAT5 и BmVAT8.

Особенно интересно положение выделенного и идентифицированного нами штамма *B. mallei* 16050, сформировавшего общий кластер с *B. mallei* mongolia_1 и генетически идентичными по MLVA-профилю *B. mallei* B-120 и его дубликатом SCPM-O-B-7146. У всех 4 штаммов выявлены идентичные DFR-профиль (DFR06) и VNTR-профили по локусам L20k и L1217k. При этом у *B. mallei* mongolia_1 и B-120 также определено одинаковое число повторов по локусам S2862k и BPSS1974^{#1}, а по локусам L933k и L3145k они отличались на 1 повтор, что позволило выделить эти штаммы в отдельную ветвь внутри кластера C. Для *B. mallei*



Сравнительный анализ результатов типирования 51 штамма *B. mallei* с помощью схемы MLVA-6 (а) и сочетанного использования схемы MLVA-6 и локуса BPSS1974^{#1} (б).

Одним цветом отмечены идентичные прикорневые кластеры. а: пунктирной линией отмечены штаммы, расположение которых изменилось при включении локуса BPSS1974^{#1}. Рамкой выделены штаммы из коллекции Волгоградского научно-исследовательского противочумного института.

16050 более тесная связь установлена со штаммом *B. mallei* B-120, поскольку их MLVA-профили содержали по 6 повторов в локусе L3145k.

Отдельную кластерную группу сформировал штамм UFAL2 (Бразилия, 2017 г.) с уникальным количеством повторов по локусам L20k ($n = 14$), S2862k ($n = 4$) и BPSS1974^{#1} ($n = 27$). При этом *B. mallei* UFAL2 наряду со штаммами из России и Монголии принадлежал к типу DFR06.

MLVA-профили дубликатов штаммов из различных коллекций были идентичны или отличались только по 1 из локусов, что позволяло им сохранять принадлежность к одному кластеру. Так, по локусу

L933k выявлены различия на 3 повтора у *B. mallei* Ц-4 и SCPM-O-B-4682 и на 1 повтор у *B. mallei* Ц-5 и SCPM-O-B-4683. Штамм Muksuwar-11 отличался от штаммов SCPM-O-B-7093 и Mukteswar (GCA_033870375.1) на 1 повтор по локусу S2862. Штамм Zagreb из коллекции нашего института отличался от Zagreb (GCA_033870355.1) на 5 повторов по локусу S2862 (табл. 2).

В результате дополнение локусом BPSS1974^{#1} схемы MLVA-6 позволило выявить более тесную генетическую связь ряда штаммов и сформировать новые кластеры, коррелирующие с их DFR-профилями.

Таблица 2. MLVA-профили дубликатов штаммов *B. mallei* из различных коллекций

Название штамма <i>B. mallei</i> (номер в GenBank)	Количество повторов в локусах						
	L933k	L3145k	L3652k	L20k	L1217k	S2862k	BPSS1974 ^{#1}
P-1*	6	5	11	7	–	6	55
SCPM-O-B-4688 (GCA_003627635.1)**	6	5	11	7	–	6	55
Muksuwar-11*	5	4	8	17	6,9	12	53
SCPM-O-B-7093 (GCA_003627585.1)**	5	4	8	17	6,9	11	53
Mukteswar (GCA_033870375.1)***	5	4	8	17	6,9	11	53
B-120*	10	6	8	17	5	6	55
SCPM-O-B-7146 (GCA_003627695.1)**	10	6	8	17	5	6	55
Ц-4*	11	7	6	17	–	8	54
SCPM-O-B-4682 (GCA_003627705.1)**	14	7	6	17	–	8	54
Ц-5*	11	7	6	17	–	8	54
SCPM-O-B-4683 (GCA_003627655.1)**	10	7	6	17	–	8	54
Bogor-37*	5	4	8	15	6,9	11	53
Bogor (GCA_033870395.1)***	5	4	8	15	6,9	11	53
Zagreb*	5	4	8	15	6,9	6	53
Zagreb (GCA_033870355.1)***	5	4	8	15	6,9	11	53

Примечание. *Штаммы *B. mallei* из коллекции Волгоградского научно-исследовательского противочумного института.

**Штаммы *B. mallei*, депонированные в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур.

***Штаммы *B. mallei* из Института Фридриха Леффлера Федерального научно-исследовательского института здоровья животных Германии.

Обсуждение

Эффективность внутривидового типирования возбудителей инфекционных заболеваний в значительной степени определяется доступностью нуклеотидных последовательностей их геномов. Проведение полногеномного секвенирования и последующая сборка генома возбудителя сапа осложнены большим количеством повторяющихся последовательностей и высоким содержанием GC. В результате из депонированных в GenBank NCBI на май 2025 г. 113 геномов *B. mallei* только 33 являлись полными, а большинство остальных геномов представлены десятками или сотнями контигов. При этом часть штаммов возбудителя сапа не были уникальными.

У ряда штаммов из сформированной нами выборки *in silico* установить VNTR-генотип по отдельным локусам было невозможно. Низкое покрытие ридями областей генома, соответствующих локусам L20k и L3652k, не позволило локализовать целевую VNTR-область в пределах одного контига у 5 штаммов. Недостаточное покрытие при секвенировании может быть обусловлено GC-составом этих регионов, составившее более 70% у референтного штамма *B. mallei* ATCC 23344.

Другая проблема при поиске целевых VNTR-локусов в неполных геномах — отсутствие соответствующих этим локусам участков генома (нуль-аллели). В этом случае не существует надёжного способа определения причины возникновения нуль-аллелей: это может быть следствием как естест-

венных эволюционных изменений, так и ошибок при сборке геномов. Нами были обнаружены нуль-аллели по локусу L1217k у 14 штаммов из выборки, 10 из которых были представлены неполными геномами, что привело к их исключению из дальнейшего исследования. При проведении ПЦР с ДНК коллекционных штаммов продукт амплификации по локусу L1217k отсутствовал у 3 штаммов. Вместе с тем нуль-аллели в полных геномах увеличивают риск ложной гомоплазии, поэтому во многих популяционных исследованиях такие локусы исключают из анализа. Однако вероятность регистрации нуль-аллеля на каждый локус возрастает при увеличении самой выборки, что может привести к исключению большого числа локусов, а это в свою очередь отрицательно повлияет на качество исследований.

В результате из первоначальной выборки были исключены 13 штаммов, а оставшийся 51 штамм *B. mallei* с помощью 6-локусной схемы VNTR-типирования был распределён по 39 MLVA-типам (HGDI = 0,981). Перспективность включения в эту схему локуса BPSS1974^{#1} определялась структурой мотива в его составе, вырожденность которого снижает вероятность ошибок ДНК-полимеразы в ходе репликации и секвенирования. При этом последовательность самого мотива находится под действием стабилизирующего отбора, что способствует его сохранению в геноме.

В проведённом нами исследовании установлено, что все VNTR-локусы имели PIC > 0,5, что ука-

зывало на их высокую дискриминационную силу, при этом эффективное число аллелей варьировало от 3,842 до 8,103 на локус и в среднем составило 6,381. По этим показателям локус BPSS1974^{#1} занимал промежуточное положение между VNTR-локусами L3145k и L933k, представленными совершенными и вырожденными мини-сателлитными повторами соответственно.

Успешная амплификация локуса BPSS1974^{#1} при проведении ПЦР с ДНК штамма *B. mallei* 16050, выделенного от больной лошади в 2023 г., свидетельствовала о стабильности областей, фланкирующих VNTR-регион. В свою очередь полно-размерная нуклеотидная последовательность локуса BPSS1974^{#1}, выявленная при анализе данных полногеномного секвенирования штамма *B. mallei* 16050, показала его перспективность при проведении *in silico* MLVA-типирования.

Полученные нами результаты кластерного анализа штаммов *B. mallei* на основе определения количества повторов в 7 VNTR-локусах были сопоставлены с данными мультилокусного сиквенс-типирования коровой области генома (core genome multilocus sequence typing, cgMLST), проведённого S. Appelt и соавт. [13]. Сравнение показало, что состав и взаимное расположение кластеров имели много общих черт. Так, по данным cgMLST, штаммы из Китая были сгруппированы в два основных кластера, соответствующие на построенной нами дендрограмме MLVA-кластерам D и L. В состав этих кластеров входили штаммы, у которых в GenBank географическим регионом происхождения указаны США: кластер L включал штаммы *B. mallei* 2002721274, JHU и FMH, а кластер D — *B. mallei* 2002721277. Установленная нами кластеризация согласовывалась с результатами cgMLST и свидетельствовала о вероятном китайском происхождении этих штаммов. Внутри кластера D подтверждена тесная связь между штаммами 2000031063 (Венгрия) и China5 (Китай), MLVA-профили которых отличались только по локусу S2862k. Наряду с данными cgMLST генетическая близость штаммов внутри MLVA-кластеров D и L подтвердилась и по результатам проведённого нами DFR-типирования. Так, за исключением *B. mallei* Kweiyang^{#4}, у которого отсутствовал продукт амплификации по локусу BmVAT6, для всех штаммов каждого кластера определён общий DFR-профиль.

Исследованные в ходе работы штаммы из Турции вошли в состав 3 разных кластеров. Дополненная локусом BPSS1974^{#1} схема MLVA-6 позволила распределить штаммы из этих кластеров в соответствии с их положением на минимальном основном дереве, построенном на основании данных cgMLST [13]. Так, по результатам типирования только с использованием схемы MLVA-6 в один кластер со штаммами из Турции был включён штамм

B. mallei PRL-20. Определение количества повторов по локусу BPSS1974^{#1} позволило выделить на дендрограмме *B. mallei* PRL-20 в отдельную ветвь со штаммом *B. mallei* India86-567-2 из Индии, а штаммы из Турции сформировали отдельный самый многочисленный кластер J. Два других штамма из Турции (*B. mallei* 11 и NCTC 10247) вошли соответственно в состав подкластера G2 и кластера F.

Включение локуса BPSS1974^{#1} в схему MLVA-6 позволило наряду со штаммом *B. mallei* India86-567-2 уточнить положение другого индийского штамма — *B. mallei* 3708, который сформировал отдельную ветвь в составе кластера C. Установленная с помощью разработанной схемы MLVA-7 кластеризация индийских штаммов согласовывалась с данными, полученными в исследовании Н. Singha и соавт. [24]. В представленной работе на основании MLVA-типирования по 23 локусам выявлена принадлежность штаммов *B. mallei* India86-567-2, Mukteswar, SAVP1, BMQ и NCTC 3708 к разным кластерам, что соответствовало полученным в ходе нашего исследования результатам.

Установленные нами MLVA- и DFR-профили бразильских штаммов подтвердили ранее выдвинутое предположение о разных актах интродукции возбудителя сапа в Бразилию [25]. Так, выявленная нами тесная генетическая связь внутри подкластера G3 между штаммами европейского происхождения и BM_sapro 2.1 свидетельствовала о возможном завозе сапа в Бразилию из Европы, вероятно, при колонизации или торговле.

Включение в схему MLVA-6 локуса BPSS1974^{#1} позволило локализовать штамм *B. mallei* 11 в соседнем подкластере G2, что соответствовало данным M.V.D. Falcão и соавт. [25]. Авторы проводили типирование штаммов по 15 филогенетически информативным однонуклеотидным полиморфизмам методом ПЦР с последующим анализом плавления высокого разрешения, в результате которого была идентифицирована ветвь L3B3sB3, включающая штаммы из сформированных в нашей работе MLVA-кластеров G2 и G3. При анализе однонуклеотидных полиморфизмов [25] также показана принадлежность штамма *B. mallei* UFAL2 к ветви L3B2, включающей штаммы, выделенные на территории Бразилии. Из-за отсутствия в Genbank нуклеотидных последовательностей других бразильских штаммов нам не удалось определить MLVA- и DFR-профили штаммов линии L3B2. Вместе с тем уникальный VNTR-профиль штамма *B. mallei* UFAL2 позволил выделить его в отдельный MLVA-кластер H, что соответствует разделению бразильских штаммов по разным филогенетическим линиям.

По результатам MLVA- и DFR-анализа установлено тесное генетическое родство между штаммами *B. mallei* B-120 и 16050, выделенными с разницей в 18 лет от больных животных на территории Вос-

точной Сибири, и штаммом *B. mallei* mongolia_1, изолированным от больной лошади в Монголии в 2022 г. Принадлежность к одному DFR-типу (DFR06) и общий уникальный VNTR-профиль по локусам L20k и L1217k, наряду с географической близостью территорий этих стран, где были зарегистрированы вспышки сапа, позволяют предположить общий источник происхождения этих штаммов. Вместе с тем *B. mallei* Ц-4 и Ц-5, выделенные в Монголии в 1967 г., сформировали отдельный MLVA-кластер. DFR-тип (DFR06) был также идентифицирован у бразильского штамма *B. mallei* UFAL2. Общие DFR-профили для штаммов из разных MLVA-кластеров были выявлены и в ряде других случаев, что может свидетельствовать о снижении специфичности выбранных DFR-локусов по мере увеличения числа нуклеотидных последовательностей геномов *B. mallei* в генетических базах данных.

Выявленные изменения в VNTR-профилях дубликатов штаммов *B. mallei* из разных коллекций могут быть связаны с условиями хранения, в частности с методами поддержания бактериальных культур. В работе J.M. U'Ren и соавт. [26] при исследовании стабильности 32 VNTR-локусов, предложенных для типирования штаммов возбудителя мелиоидоза, с помощью метода серийных пассажей на чашках установлены изменения в 12 локусах. При этом мутации были выявлены в локусах L933k, L3145k и S2862k, которые вошли в разработанную нами схему типирования штаммов возбудителя сапа. Установленная в нашей работе вариативность локусов L933k и S2862k в геномах дубликатов штаммов *B. mallei* свидетельствовала о сходном характере изменчивости этих VNTR-локусов у патогенных буркхольдерий. Для локуса BPSS1974^{#1} определена стабильность его молекулярной структуры у штаммов в условиях разных коллекций, что важно при проведении эпидемиологических расследований и эволюционного анализа.

Заключение

VNTR-локус BPSS1974^{#1} можно расценивать как маркер, включение которого в схему MLVA-6 позволит повысить точность генотипирования и установления регионов происхождения вновь выделенных штаммов возбудителя сапа. Наряду с совершенствованием схем дифференциации штаммов возбудителя сапа для более эффективного внутривидового типирования необходимо увеличение количества доступных для анализа нуклеотидных последовательностей геномов *B. mallei* в сочетании с дополнением метаданных о точном географическом происхождении.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Топорков А.В., Виктор Д.В., Липницкий А.В. и др. *Мелиоидоз и сап*. Волгоград;2016. Toporkov A.V., Viktorov D.V.,

- Lipnitsky A.V., et al. *Melioidosis and Glanders*. Volgograd;2016. EDN: <https://elibrary.ru/wlrord>
2. Khan I., Wieler L.H., Melzer F., et al. Glanders in animals: a review on epidemiology, clinical presentation, diagnosis and countermeasures. *Transbound. Emerg. Dis.* 2013;60(3):204–21. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2012.01342.x>
3. Raj A., Pathak A., Karuppusamy S., et al. Knowledge, awareness and perception about equine glanders among veterinarians and medical professionals in India. *Front. Vet. Sci.* 2024;11:1334485. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1334485>
4. Никифоров В.В., Мельникова Л.И., Зарьков К.А. и др. Сап: случай из практики. *Инфекционные болезни*. 2005;3(1): 89–92. Nikiforov V.V., Melnikova L.I., Zar'kov K.A., et al. Glanders: a clinical case. *Infectious Diseases*. 2005;3(1):89–92. EDN: <https://elibrary.ru/iadiwd>
5. Srinivasan A., Kraus C.N., Deshazer D., et al. Glanders in a military research microbiologist. *N. Engl. J. Med.* 2001;345(4):256–8. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJM200107263450404>
6. Онищенко Г.Г., Топорков А.В., Липницкий А.В., Виктор Д.В. Проблемы противодействия биологическому терроризму на современном этапе. *Инфекционные болезни. Новости. Мнения. Обучение*. 2016;1(14):24–31. Onishchenko G.G., Toporkov A.V., Lipnitsky A.V., Viktorov D.V. Problems of counteraction to biological terrorism at the present stage. *Infectious Diseases: News, Opinions, Training*. 2016;(1):24–31. EDN: <https://elibrary.ru/vretnz>
7. Gilad J., Harary I., Dushnitsky T., et al. *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* as bioterrorism agents: national aspects of emergency preparedness. *Isr. Med. Assoc. J.* 2007;9(7):499–503.
8. Guilhot A., Bricaire F., Bossi P. Glanders, melioidosis and biowarfare. *Presse Med.* 2005;34(2 Pt. 2):185–8. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0755-4982\(05\)83900-4](https://doi.org/10.1016/s0755-4982(05)83900-4) (in French)
9. Мельникова Л.А., Букова Н.К., Макаев Х.Н. и др. Сап: особо опасное инфекционное заболевание, его характеристика, эпизоотология и диагностика. *Ветеринарный врач*. 2016;(4):22–5. Melnikova L.A., Bukova N.K., Makaev H.N., et al. Glanders — particularly dangerous disease: characterization, epizootology and detection. *Veterinarian*. 2016;(4):22–5. EDN: <https://elibrary.ru/whtgvj>
10. Go P.C., Sansthan A. Glanders — a re-emerging zoonotic disease. *J. Biol. Sci.* 2014;14(1):38–51. DOI: <https://doi.org/10.3923/jbs.2014.38.51>
11. Kettle A.N., Wernery U. Glanders and the risk for its introduction through the international movement of horses. *Equine Vet. J.* 2016;48(5):654–8. DOI: <https://doi.org/10.1111/evj.12599>
12. Elschner M.C., Klaus C.U., Liebler-Tenorio E., et al. *Burkholderia mallei* infection in a horse imported from Brazil. *Equine Vet. Educ.* 2009;21(3):147–50. DOI: <https://doi.org/10.2746/095777309X401071>
13. Appelt S., Rohleder A.M., Jacob D., et al. Genetic diversity and spatial distribution of *Burkholderia mallei* by core genome-based multilocus sequence typing analysis. *PLoS One*. 2022;17(7):e0270499. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270499>
14. Girault G., Wattiau P., Saqib M., et al. High-resolution melting PCR analysis for rapid genotyping of *Burkholderia mallei*. *Infect. Genet. Evol.* 2018;63:1–4. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.05.004>
15. Hornstra H., Pearson T., Georgia S., et al. Molecular epidemiology of glanders, Pakistan. *Emerg. Infect. Dis.* 2009;15(12):2036–9. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1512.090738>
16. Losada L., Ronning C.M., DeShazer D., et al. Continuing evolution of *Burkholderia mallei* through genome reduction and large-scale rearrangements. *Genome Biol. Evol.* 2010;2:102–16. DOI: <https://doi.org/10.1093/gbe/evq003>

17. Бондарева О.С., Ткаченко Г.А., Леденева М.Л. и др. Разработка схемы генотипирования возбудителя сапа на основе мультилокусного анализа числа переменных тандемных повторов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019;96(5):8–16. Bondareva O.S., Tkachenko G.A., Ledenyova M.L., et al. Development of genotyping method of the glanders causative agent based on multiple locus variable-number tandem repeat analysis. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2019;96(5):8–16. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-5-8-16> EDN: <https://elibrary.ru/osgwxb>
18. Леденева М.Л., Ткаченко Г.А., Захарова И.Б. Новые генетические маркеры для типирования штаммов *Burkholderia pseudomallei*. *Инфекция и иммунитет*. 2022;12(6):1091–102. Ledenyova M.L., Tkachenko G.A., Zaharova I.B. New genetic markers for *Burkholderia pseudomallei* strains typing. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2022;12(6):1091–102. EDN: <https://elibrary.ru/gdlreo>
19. Бондарева О.С., Савченко С.С., Ткаченко Г.А. и др. Генотипирование штаммов *Burkholderia mallei* на основе метода амплификации дифференцирующих фрагментов ДНК. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2016;34(1):33–7. Bondareva O.S., Savchenko S.S., Tkachenko G.A., et al. Genotyping of the *Burkholderia mallei* strains based on different region analysis. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2016;34(1):33–7. DOI: <https://doi.org/10.18821/0208-0613-2016-34-1-33-37> EDN: <https://elibrary.ru/vxmnaaz>
20. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., et al. Spades: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012;19(5):455–77. DOI: <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
21. Schluter P.M., Harris S.A. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Mol. Ecol. Notes*. 2006;6(2): 569–72.
22. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* 2021;38(7):3022–7. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
23. Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 1988;26(11):2465–6. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988>
24. Singha H., Elschner M.C., Malik P., et al. Molecular typing of *Burkholderia mallei* isolates from equids with glanders, India. *Emerg. Infect. Dis.* 2021;27(6):1745–8. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2706.203232>
25. Falcão M.V.D., Laroucau K., Vorimore F., et al. Molecular characterization of *Burkholderia mallei* strains isolated from horses in Brazil (2014–2017). *Infect. Genet. Evol.* 2022;99:105250. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105250>
26. U'Ren J.M., Schupp J.M., Pearson T., et al. Tandem repeat regions within the *Burkholderia pseudomallei* genome and their application for high resolution genotyping. *BMC Microbiol.* 2007;7:23. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-23>

Информация об авторах

Леденева Маргарита Леонтьевна — н. с. лаб. генодиагностики особо опасных инфекций Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, Волгоград, Россия, volresin@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5923-4774>

Бондарева Ольга Сергеевна — канд. мед. наук, с. н. с. лаб. генодиагностики особо опасных инфекций Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, Волгоград, Россия, fiat-lux@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5690-6686>

Ткаченко Галина Александровна — канд. мед. наук, доцент, в. н. с. отд. биологического и технологического контроля Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, Волгоград, Россия, tkachenko_g@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0199-3342>

Устинов Димитрий Владимирович — н. с. лаб. биоинформационного анализа Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, Волгоград, Россия, naugron@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-4516-731X>

Захарова Ирина Борисовна — д-р биол. наук, доцент, в. н. с. лаб. патогенных буркхольдерий Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, Волгоград, Россия, zib279@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7808-7658>

Участие авторов: Леденева М.Л. — концепция и дизайн исследования, проведение типирования штаммов *in silico*, анализ и интерпретация данных, написание текста статьи, формирование окончательного варианта статьи для публикации; Бондарева О.С. — проведение типирования штаммов *in vitro*, анализ и интерпретация данных; Ткаченко Г.А. — анализ данных, редактирование рукописи; Устинов Д.В. — проведение полногеномного секвенирования, обработка полученных результатов; Захарова И.Б. — работа с бактериями штаммами, 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 07.07.2025;
принята к публикации 14.09.2025;
опубликована 31.10.2025

Information about the author

Margarita L. Ledenyova — researcher, Laboratory of gene diagnostics of particularly dangerous infections, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russia, volresin@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5923-4774>

Olga S. Bondareva — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of gene diagnostics of particularly dangerous infections, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russia, fiat-lux@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5690-6686>

Galina A. Tkachenko — Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, leading researcher, Department of biological and technological control, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russia, tkachenko_g@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0199-3342>

Dimitriy V. Ustinov — researcher, Laboratory of bioinformatics analysis, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russia, naugron@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-4516-731X>

Irina B. Zakharova — Dr. Sci. (Biol.), Associate Professor, leading researcher, Laboratory of pathogenic burkholderia, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russia, zib279@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7808-7658>

Authors' contribution: Ledenyova M.L. — concept and design of the study, *in silico* strain typing, data analysis and interpretation, writing the article, forming the final version of the article for publication; Bondareva O.S. — *in vitro* strain typing, data analysis and interpretation; Tkachenko G.A. — data analysis, editing the manuscript; Ustinov D.V. — whole-genome sequencing, processing the obtained results; Zakharova I.B. — work with bacterial strains, editing the manuscript. 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 07.07.2025;
accepted for publication 14.09.2025;
published 31.10.2025

ОБЗОРЫ

Научный обзор

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-682>

Иммунологическая и эпидемиологическая эффективность вакцинации детей против гепатита А с применением одной дозы инактивированной вакцины

Лопатухина М.А.^{1,2✉}, Кюрегян К.К.^{1,2,3}, Михайлов М.И.^{1,2,4}¹Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;²Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия;³Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия;⁴Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

Аннотация

Гепатит А — это острое заболевание печени, вызываемое вирусом гепатита А, которое можно предотвратить с помощью вакцинации. Стандартная схема вакцинации против гепатита А предполагает введение двух доз инактивированной вакцины, однако по экономическим соображениям и для повышения уровня охвата вакцинацией в некоторых регионах мира внедрены программы массовой вакцинации детей с применением одной дозы вакцины.

Целью обзора является обобщение и анализ опубликованных данных о длительности сохранения протективных уровней антител после однократной иммунизации детей, а также о заболеваемости в странах, в которых проводится вакцинопрофилактика гепатита А с использованием одной дозы инактивированной вакцины.

Данные последних лет, полученные в разных регионах мира, в том числе в России, подтверждают эффективность стратегии вакцинации против гепатита А с применением одной дозы вакцины как с точки зрения длительности сохранения иммунологического ответа, так и с точки зрения влияния на уровни регистрируемой заболеваемости. Однако для оценки продолжительности защиты и необходимости ревакцинации на более позднем этапе жизни необходимы дальнейшие исследования по долгосрочной эффективности стратегий вакцинации с применением одной дозы инактивированной вакцины, а также непрерывный надзор за гепатитом А.

Ключевые слова: гепатит А, вакцина против гепатита А, однократная иммунизация

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: Лопатухина М.А., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Иммунологическая и эпидемиологическая эффективность вакцинации детей против гепатита А с применением одной дозы инактивированной вакцины. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2025;102(5):626–634.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-682>EDN: <https://www.elibrary.ru/USUKRM>

Review

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-682>

Immunological and epidemiological effectiveness of pediatric vaccination against hepatitis A using a single dose of inactivated vaccine

Mariya A. Lopatukhina^{1,2✉}, Karen K. Kyuregyan^{1,2,3}, Mikhail I. Mikhailov^{1,2,4}¹Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia;²Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia;³Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia;⁴Belgorod National Research University, Belgorod, Russia

Abstract

Hepatitis A is an acute liver disease caused by the hepatitis A virus (HAV), which can be prevented by means of vaccination. The standard hepatitis A vaccination schedule consists of two doses of inactivated vaccine, but for economic reasons and the purpose of improving vaccination coverage, universal pediatric single-dose vaccination programs have been implemented in certain regions of the world.

The **aim** of this review is to summarize and analyze published data on the duration of protective antibody levels after a single-dose pediatric immunization, as well as hepatitis A incidence in countries where hepatitis A vaccination is carried out using a single dose of inactivated vaccine.

Recent data from different regions of the world, including the Russian Federation, support the effectiveness of the single-dose hepatitis A vaccination strategy, both in terms of the duration of the immune response and the impact on the incidence rates. However, further studies on the long-term effectiveness of single-dose immunization with inactivated vaccine, as well as continuous hepatitis A surveillance, are necessary to assess the duration of protection and the necessity for booster vaccination later in life.

Keywords: *hepatitis A; hepatitis A vaccine; single-dose immunization*

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: Lopatukhina M.A., Kyuregyan K.K., Mikhailov M.I. Immunological and epidemiological effectiveness of pediatric vaccination against hepatitis A using a single dose of inactivated vaccine. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(5):626–634.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-682>

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

Введение

Гепатит А (ГА) — это острое заболевание печени, вызываемое вирусом гепатита А (ВГА), которое можно предотвратить с помощью вакцинации. Существуют два типа вакцин против ГА: живые аттенуированные вакцины, применяющиеся в Китае [1], и инактивированные вакцины (ИАВ), доступные во всём мире [2]. Целенаправленная иммунизация представителей групп риска эффективна в предотвращении единичных случаев и небольших вспышек ГА, но не приводит к формированию значительной иммунной прослойки, следовательно, неэффективна с точки зрения снижения заболеваемости ГА среди населения в целом [3]. Доказано, что стратегия массовой вакцинации детей младшего возраста даёт значительный эпидемиологический и экономический эффект в регионах с переходной эндемичностью от высокой к средней в отношении ГА. В таких регионах циркуляция ВГА среди детей снижается из-за улучшения санитарных условий, и в результате увеличивается доля восприимчивых подростков и взрослых. Поскольку у детей в возрасте до 5 лет ВГА-инфекция обычно протекает бессимптомно, а с возрастом доля клинически выраженных случаев возрастает, это приводит к общему увеличению числа клинически значимых и тяжёлых случаев заболевания. По рекомендации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), значительное число стран включили универсальную двухдозовую вакцинацию против ГА в национальные программы иммунизации детей (Израиль, Панама, Турция, Греция, Казахстан, Монголия, Республика Корея, Австралия, Саудовская Аравия, Катар и Бахрейн) или внедрили региональные про-

граммы для определённых частей страны (Россия, США, Китай, Италия) [4].

Стандартная схема иммунизации ИАВ против ГА состоит из 2 доз, вводимых с интервалом 6 мес, и обеспечивает выработку протективных уровней антител к ВГА (анти-ВГА), сохраняющихся на протяжении десятилетий [5]. По экономическим соображениям и для повышения уровня охвата вакцинацией в некоторых странах была внедрена однократная вакцинация ИАВ против ГА. Впервые массовая однократная вакцинация детей младшего возраста была проведена в Аргентине в 2005 г. [6]. В 2013 г. Республика Корея также ввела однократную вакцинацию для военнослужащих [7]. В 2014 г. в Бразилии была начата массовая вакцинация детей старше 12 мес с применением 1 дозы вакцины [8]. В дальнейшем ещё ряд стран отдал предпочтение однодозовой иммунизации при проведении массовой вакцинации детей против ГА (Чили, Парагвай, Колумбия, Мексика, Канада (Квебек), Тунис, Туркменистан) [4].

Основываясь на опыте Аргентины и в соответствии с рекомендациями ВОЗ, в Республике Тыва (Российская Федерация) с августа 2012 г. начали проводить всеобщую вакцинацию против ГА детей в возрасте 3 лет и старше с применением 1 дозы вакцины [9]. Поскольку продолжительность иммунной защиты при введении только одной дозы ИАВ по-прежнему вызывает озабоченность, в странах, введших однократную иммунизацию против ГА, продолжается мониторинг эпидемиологической и иммунологической эффективности такой стратегии вакцинации.

Целью настоящего обзора является обобщение и анализ опубликованных данных длитель-

ности сохранения протективных уровней антител после однократной иммунизации детей, а также о заболеваемости в странах, в которых проводится вакцинопрофилактика ГА с использованием 1 дозы вакцины.

Длительность сохранения протективного иммунитета после введения 1 дозы инактивированной вакцины против гепатита А в отдельных когортах

Данные по иммуногенности ИАВ против ГА поддерживают возможность однократной иммунизации. Так, через 2–4 нед после введения 1-й дозы ИАВ анти-ВГА класса IgG в титрах выше 20 мМЕ/мл (величина, принятая в качестве протективного уровня) вырабатываются у 100% иммунокомпетентных детей и молодых взрослых [10]. Кроме того, однократное введение ИАВ позволяет успешно купировать вспышки ГА и предотвращать заболевание у контактных лиц [11]. Представления о необходимости введения бустерной дозы ИАВ против ГА изначально были основаны на предположениях о снижении уровней антител со временем. Однако длительные наблюдения, проводившиеся среди европейцев, вакцинированных перед путешествиями в эндемичные регионы, продемонстрировали сохранение протективных уровней анти-ВГА на протяжении как минимум 4–11 лет после введения 1 дозы вакцины [12]. Первые рандомизированные испытания иммунизации с применением 1 дозы ИАВ против ГА были проведены в 2003 г. в Никарагуа [13]. В исследование были включены 239 детей в возрасте 1,5–6,0 года, негативных по анти-ВГА, период наблюдения составил 18 мес. Случаи инфицирования ВГА, подтверждённые выявлением анти-ВГА IgM, были зарегистрированы у 4 детей в группе вакцинированных и у 22 детей, не получавших вакцину. Все 4 случая инфицирования ВГА у вакцинированных детей произошли в течение первых 6 нед после иммунизации, что указывает на заражение до вакцинации или в первые дни после процедуры. Таким образом, протективная эффективность вакцинации 1 дозой составила 85% в первые 6 нед и 100% через 6 нед после иммунизации. В проведённом в Таиланде исследовании оценивали иммуногенность 1 дозы вакцины через 18 мес наблюдения среди 193 здоровых детей, доля лиц с протективными уровнями анти-ВГА составила 98%, а среднее геометрическое титра (СГТ) антител не отличалось от величины, наблюдаемой через 6 мес после введения 1-й дозы вакцины [14]. В проведённом в Аргентине исследовании, включавшем 546 здоровых детей, протективные уровни анти-ВГА наблюдались у 99,7% участников через 3 года после однократной иммунизации, и у 100% после стандартной двухдозовой схемы иммунизации [15]. Следует отметить, что в данном

исследовании в качестве протективной концентрации анти-ВГА была принята величина 10 мМЕ/мл, а не 20 мМЕ/мл, в соответствии с пересмотренной позицией экспертного сообщества о минимальной протективной концентрации анти-ВГА [16].

В 2 исследованиях проводили прямое сравнение иммуногенности и длительности сохранения протективных уровней антител при введении 1 или 2 доз ИАВ против ГА детям. В первом исследовании через 8 лет после вакцинации отмечались различия как в частоте выявления протективных уровней анти-ВГА при одно- и двухдозовой схемах иммунизации (74,3% против 97,7%), так и в значениях СГТ (123,9 мМЕ/мл против 40,2 мМЕ/мл) [17]. Во втором исследовании 100 и 96,7% участников, получивших 2 и 1 дозу ИАВ против ГА соответственно, имели протективные уровни анти-ВГА через 7 лет после вакцинации, но уровни СГТ были выше среди тех, кто получал 2 дозы вакцины (712,5 мМЕ/мл против 125,6 мМЕ/мл) [18].

Таким образом, данные о длительности сохранения анти-ВГА в отдельных когортах после однократного введения ИАВ против ГА позволили рассматривать возможность применения такой однодозовой тактики при реализации программ массовой вакцинации против ГА.

Иммунологическая эффективность однократной вакцинации против гепатита А в программах массовой иммунизации

Первой в мире массовую вакцинацию против ГА с применением 1 дозы вакцины ввела Аргентина в 2005 г. после общенациональной вспышки в 2003–2004 гг. Вакцинация проводится среди детей в возрасте 12 мес и старше, с 2006 г. охват вакцинацией составил более 90%, при этом средний показатель охвата по всей стране в 2006–2011 гг. составлял 96,8% (77–100%). Только в 3 из 24 провинций за этот период охват не превысил 90% [19, 20]. После начала кампании Министерство здравоохранения Аргентины организовало непрерывное и усиленное наблюдение за заболеваемостью ГА и напряжённостью поствакцинального иммунитета [21]. Среди детей, обследованных через 4 года после однократной иммунизации в возрасте 12 мес, защитный уровень антител (10 мМЕ/мл и выше) был выявлен в 93% случаев [20]. Основываясь на этих результатах, в апреле 2012 г. Стратегическая консультативная группа экспертов по иммунизации ВОЗ пришла к выводу о том, что национальные программы иммунизации могут рассматривать включение однодозовых схем иммунизации с применением ИАВ против ГА в графики иммунизации в качестве приемлемой альтернативы стандартному двухдозовому режиму, при этом региональные органы здравоохранения должны регулярно проводить мониторинг долгосрочной иммунологической

защиты при однократной схеме вакцинации [22]. В соответствии с этой рекомендацией Министерство здравоохранения Аргентины в 2013 г. провело второе исследование по оценке долгосрочной распространённости защитных антител среди 1088 детей в среднем через 7,7 года (6,3–9,2 года) после вакцинации однократной дозой вакцины в возрасте 12 мес. У 97,4% участников исследования концентрация анти-ВГА составила ≥ 10 мМЕ/мл, а величина СГТ — 170,5 мМЕ/мл [23]. В настоящее время, на основании опыта Аргентины, имеются данные о сохранении протективных уровней анти-ВГА на протяжении срока до 12 лет после однократной иммунизации. Величина серопротекции составила через 12 лет 93%, хотя эти данные получены на очень маленькой когорте — 27 детей [24].

Данные, полученные в Бразилии в результате реализации программы иммунизации детей с применением 1 дозы ИАВ против ГА, начатой в 2014 г., также свидетельствуют об иммунологической эффективности такого подхода. Так, через 6–7 лет после иммунизации уровень серопротекции составил 64,2% [25], при этом доля серопозитивных в когорте, обследованной через 1 мес после иммунизации, составляла 93,6% [26].

Приоритетные данные о длительности сохранения анти-ВГА после однократной иммунизации получены в одном из регионов Российской Федерации — Республике Тыва. С 2012 г. в Республике Тыва, где уровень заболеваемости ГА в допрививочный период превышал среднероссийский в 10–15 раз, проводится всеобщая однократная вакцинация против ГА детей в возрасте от 3 лет и старше. К концу 2012 г. 65 097 детей получили однократную иммунизацию, в результате чего охват детей в возрасте 3–8 лет составил 87,4% [9]. С тех пор вакцинация против ГА включена в региональный календарь прививок Тывы для детей в возрасте от 3 лет и старше. Иммунологическую эффективность однократной иммунизации детей в Тыве оценивали в 5 независимых когортах, обследованных через 1 мес, 1,

5, 9 и 11 лет после вакцинации [9, 27]. Полученные в этих работах результаты обобщены на **рис. 1**.

Защитные концентрации анти-ВГА (10 мМЕ/мл и выше) были обнаружены у 98,0% обследованных через 1 мес после однократной иммунизации, у 93,5, 91,1, 99,4 и 75,4% детей через 1, 5, 9 и 11 лет после однократной иммунизации соответственно [9, 27]. Различия в показателях серопротекции между когортами, обследованными через 1, 5 и 9 лет после вакцинации, не были статистически значимыми, хотя наблюдаемое снижение частоты выявления протективных уровней анти-ВГА было статистически значимым по сравнению с когортой, обследованной через 1 мес после вакцинации. В когорте, обследованной через 11 лет после однократной иммунизации, снижение частоты выявления протективных уровней антител было статистически значимым по сравнению с предыдущими годами. Значения СГТ анти-ВГА также были сходными в когортах, обследованных через 1, 5 и 9 лет (449,6, 577,3 и 1446,3 мМЕ/мл соответственно; $p > 0,05$), но в когорте, обследованной через 11 лет после вакцинации, было отмечено достоверное снижение этого показателя (282,6 мМЕ/мл; $p < 0,05$) [27].

Данные о длительности сохранения протективных уровней анти-ВГА после однократной иммунизации в рамках программ массовой вакцинации обобщены в **табл. 1**. В совокупности эти данные позволяют предположить, что гуморальный иммунитет к ВГА после однократной вакцинации может снижаться быстрее по сравнению со стандартной схемой вакцинации 2 дозами, которая обеспечивает серопротекцию у более чем 90% вакцинированных детей на срок до 15 лет [2, 28]. Однако следует отметить, что снижение гуморального иммунитета не обязательно указывает на отсутствие потенциальной защиты от ВГА. Исследование ВГА-специфичного Т-клеточного ответа у детей в возрасте до 12 лет после однократной вакцинации продемонстрировало наличие CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток памяти у 53,8 и 26,9% серонегативных детей соответственно [24].

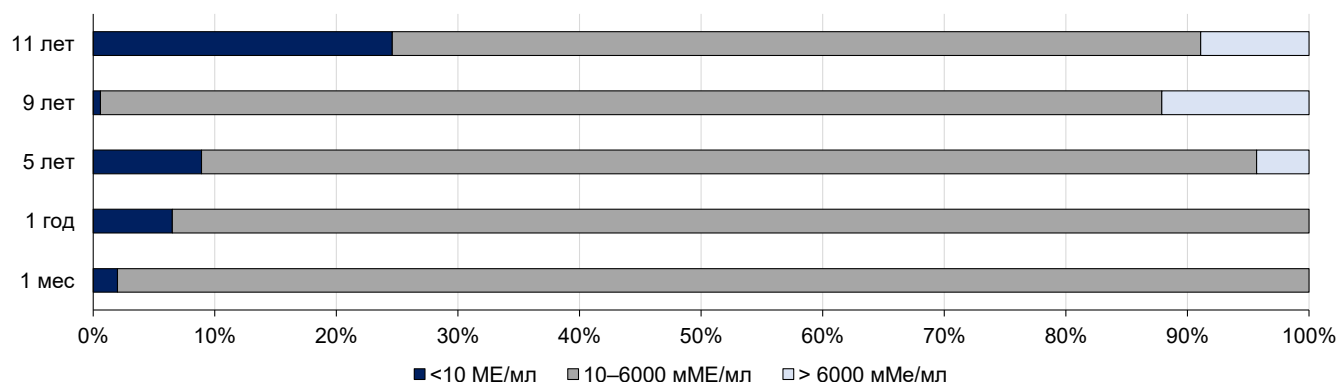


Рис. 1. Доля детей с разными концентрациями анти-ВГА после однократной вакцинации против ГА в Республике Тыва (адаптировано из [27]).

Таблица 1. Длительность сохранения протективных уровней антител к ВГА после однократного введения ИАВ при проведении массовой иммунизации детей

Страна/регион	Максимальная длительность наблюдения, годы	Доля лиц с протективными уровнями анти-ВГА, %	Источник
Аргентина	4 года	93,0	[20]
	7,7 года	97,4	[23]
	12 лет	93,0	[24]
Бразилия	7 лет	64,2	[25]
Российская Федерация (Республика Тыва)	5 лет	91,1	[9]
	9 лет	99,4	[27]
	11 лет	75,4	[27]

Аналогично, выработка интерферона- γ в мононуклеарных клетках периферической крови, стимулированных антигеном VP1 ВГА, была отмечена у 32,4% серонегативных детей через 6–7 лет после однократной вакцинации ИАВ, что указывает на наличие клеточно-опосредованной иммунной памяти [25].

Эпидемиологическая эффективность однократной вакцинации против гепатита А в программах массовой иммунизации

Эпидемиологическая эффективность программ массовой вакцинации детей против ГА, реализуемых с применением стандартной двухдозовой схемы иммунизации, оцениваемая по снижению показателя регистрируемой заболеваемости, числа госпитализаций, ВГА-ассоциированной смертности и количества ВГА-положительных проб окружающей среды, хорошо известна и описана во всех странах, внедривших такие программы [2, 4]. Данные по эпидемиологической эффективности программ вакцинации против ГА с применением 1 дозы приведены в **табл. 2**.

В Аргентине, введшей однодозовую вакцинацию в 2005 г., заболеваемость ГА снизилась на $\geq 88,0\%$, с 66,5 (в 2000–2002 гг.) до 7,9 (в 2006–2011 гг.) случая на 100 000 жителей при охвате вакцинацией в среднем в 2006–2011 г., равном 96,8%. Кроме того, в 2007–2022 гг. не было зафиксировано ни одного ассоциированного с ВГА случая фульминантного гепатита или пересадки печени, притом что в до-

вакцинальный период ВГА был основной причиной фульминантного гепатита и пересадки печени у детей [29]. В Бразилии, где массовая вакцинация детей с применением 1 дозы вакцины против ГА была внедрена в 2014 г., охват вакцинацией варьировал от 60,1 до 97,1% в 2014–2017 гг. Регистрируемые ежегодные показатели заболеваемости ГА снизились с 3,02–3,48 случая на 100 тыс. человек в 2010–2013 гг. до 0,47–1,46 случая на 100 тыс. человек в 2015–2017 гг. В 2014–2016 гг. совокупное снижение случаев ГА в Бразилии составило 85,5%. Наиболее существенное снижение заболеваемости ГА наблюдалось среди детей в возрасте до 14 лет, но снижение также наблюдалось в других возрастных группах [8].

В Республике Корея вакцинация с применением 1 дозы ИАВ против ГА была внедрена для военнослужащих с 2013 г. Чтобы оценить эффективность данной программы вакцинации, была проанализирована заболеваемость ГА среди привитых и непривитых военнослужащих в период внедрения вакцинации, в 2013–2016 гг. Среди вакцинированных военнослужащих заболеваемость составила 3 случая на 603 550 человек в год, а среди невакцинированных — 21 случай на 1 020 450 человек в год (что соответствует 0,5 против 2,06 на 100 тыс. человек). Таким образом, эффективность однократной вакцинации против ГА составила 75,85% [7].

Заболеваемость ВГА в Тыве в довакцинальный период (2001–2012 гг.) была самой высокой

Таблица 2. Эпидемиологическая эффективность программ вакцинации с применением 1 дозы ИАВ против ГА

Год внедрения	Страна/регион	Подлежащие вакцинации группы	Эффективность	Источник
2005	Аргентина	Дети ≥ 12 мес	Снижение заболеваемости на 88% в 2006–2011 гг.; исчезновение случаев фульминантного ГА	[29]
2012	Российская Федерация (Республика Тыва)	Дети ≥ 3 лет	Снижение заболеваемости в 2013 г. в среднем на 96,7% и на 96,9% среди детей. Отсутствие регистрируемых случаев заболевания с 2016 г.	[9, 27]
2013	Республика Корея	Военнослужащие	Снижение заболеваемости на 75,9% через 1,5–2,0 года после внедрения	[7]
2014	Бразилия	Дети в возрасте 15–24 мес	Снижение заболеваемости в 2014–2016 гг. в среднем на 85,5%, на 96,8% среди детей	[8]

в России, при этом большинство случаев регистрировалось среди детей и подростков моложе 18 лет, в этой группе пиковые показатели заболеваемости достигали 450–860 случаев на 100 тыс. человек (рис. 2). После введения однодозовой иммунизации детей в 2012 г. заболеваемость резко снизилась до 7,5 случая на 100 тыс. человек среди детей и подростков моложе 18 лет и до 3,2 случая на 100 тыс. человек в общей популяции через год после начала программы вакцинации. С 2016 г. в регионе не зарегистрировано ни одного случая ГА, не только среди вакцинированных детей, но и среди невакцинированных взрослых.

Следует отметить, что в 2013–2023 гг. на фоне нулевой или почти нулевой заболеваемости ГА в Тыве в соседних регионах регистрировались значительные показатели заболеваемости ГА, что подтверждает, что снижение заболеваемости в Тыве не является следствием снижения циркуляции ВГА во всем Сибирском федеральном округе. Так, в 2013–2023 гг. заболеваемость ГА в Республике Бурятия варьировала от 0,1 до 6,48 на 100 тыс. человек, в Республике Хакасия — от 0,19 до 34,55, в Иркутской области — от 0,04 до 9,83, в Красноярском крае — от 0,0 до 34,93 [27]. Кроме того, высокие ежегодные показатели заболеваемости энтеровирусными инфекциями и шигеллёзом, регистрировавшиеся в Тыве в 2013–2023 гг., указывают на сохранение санитарного неблагополучия в регионе [27]. Эти данные свидетельствуют о том, что снижение заболеваемости ГА, наблюдавшееся в 2013–2023 гг. в Тыве, не было связано с улучшением санитарных условий, а являлось следствием программы вакцинопрофилактики.

Частота выявления РНК ВГА в пробах окружающей среды (сточные воды, открытые водоёмы) является важным показателем, отражающим интенсивность циркуляции вируса, и, следовательно, представляет собой важный критерий эпидемиологической эффективности вакцинопрофилактики ГА. Ожидается, что значительное снижение числа случаев симптоматической ВГА-инфекции будет сопровождаться снижением показателей обнаружения ВГА в сточных водах. Однако мониторинг РНК ВГА в сточных водах и различных открытых водоёмах Тывы, проводившийся в 2021–2023 гг., подтвердил сохранение выделения вируса в окружающую среду [27]. Более того, филогенетический анализ подтвердил, что последовательности ВГА, выделенные из проб воды в Тыве в 2021 и 2022 гг., принадлежали к группе генетических вариантов, которые выделялись у больных в этом регионе в 2008 г. (в довакцинальный период), что позволяет предположить стабильную циркуляцию именно этого варианта вируса. Однако в 2023 г. в пробах сточных вод и окружающей среды был выявлен другой вариант ВГА, близкий к последовательностям, выделявшимся в 2019–2023 гг. в разных регионах России, в том числе в граничащей

с Тывой Иркутской области [27]. Эта находка подтверждает завоз нового штамма в Тыву.

На основании представленных данных нельзя однозначно утверждать, что стратегия однократной вакцинации привела к уменьшению частоты выявления РНК ВГА в пробах сточных вод в Тыве, поскольку ранее в регионе такой мониторинг не проводился. Однако в 2002–2004 гг. в Тыве было проведено тестирование образцов сточных вод на антиген ВГА, в результате чего доля положительных результатов составила 12,5–63,3% [30]. Учитывая, что средняя доля образцов, положительных по РНК ВГА, в 2021–2023 гг. была ниже 2,5%, можно предположить, что вакцинация всё-таки привела к значительному снижению выделения вируса в регионе.

В ходе мониторинга РНК ВГА в объектах окружающей среды в Аргентине, проведённого в 2009–2010 и 2017–2022 гг., также было выявлено постоянное присутствие РНК ВГА в сточных водах [31, 32]. Однако, в отличие от Тывы, обнаружение РНК ВГА в пробах сточных вод в Аргентине коррелирует со случаями острого ГА [33].

Возможное объяснение продолжающегося выделения вируса в Тыве и его обнаружения в объектах окружающей среды и сточных водах, несмотря на отсутствие зарегистрированных случаев острого ГА, может быть связано с возрастом вакцинируемых детей. Очевидно, что выделение вируса при отсутствии зарегистрированных случаев заболевания, скорее всего, указывает на наличие бессимптомной инфекции, поскольку у детей до 5 лет ВГА-инфекция чаще всего протекает бессимптомно [23]. В большинстве стран, внедривших массовую вакцинацию против ГА, иммунизация детей проводится в возрасте 12 мес и старше [2]. Однако в Тыве введена однократная вакцинация детей от 3 лет и старше, прежде всего для того, чтобы иметь возможность использовать отечественную вакцину против ГА, лицензированную для детей в возрасте 3 года и старше. Таким образом, дети до 3 лет не иммунизированы и остаются восприимчивыми к ВГА.

Наиболее вероятной гипотезой, объясняющей сохранение циркуляции ВГА при отсутствии симптоматических случаев, является передача вируса среди детей до 3 лет. Подтверждением скрытой циркуляции ВГА в Тыве является и увеличение со временем доли лиц с высокими (выше 6000 мМЕ/мл) концентрациями анти-ВГА [27], свидетельствующими о бустировании поствакцинального гуморального ответа при встрече с вирусом.

Накопленный к настоящему времени опыт применения однократной иммунизации при реализации программ вакцинопрофилактики ГА продемонстрировал высокую эпидемиологическую эффективность такого подхода и сохранение иммунологической эффективности как минимум в десятилетней перспективе. В то же время тем, кто

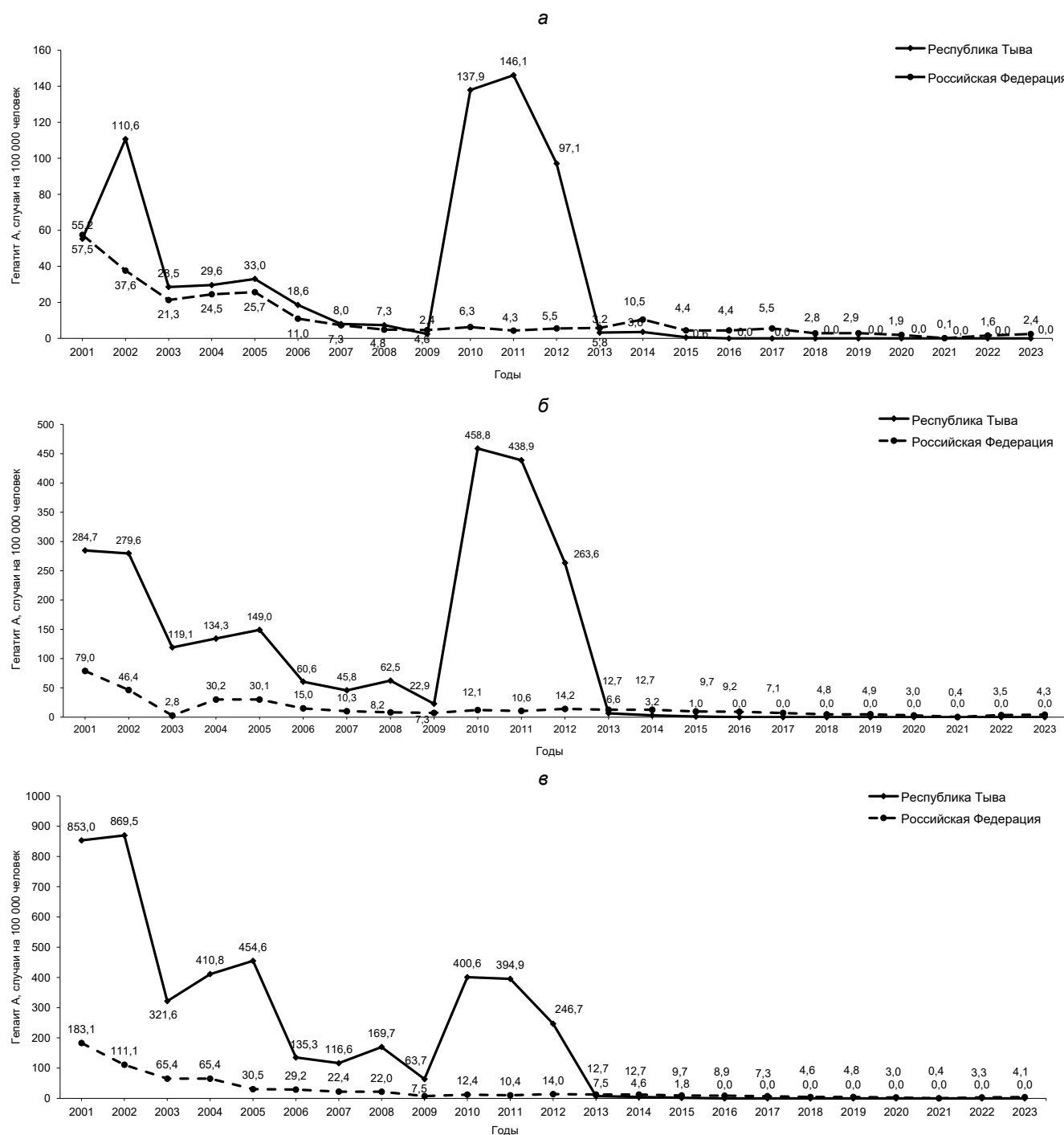


Рис. 2. Заболеваемость ВГА в Республике Тыва и средняя по стране за 2001–2023 гг. среди общей популяции (а), детей в возрасте 0–14 (б) и 0–17 лет (в). Адаптировано из [27].

получил 1 дозу ИАВ против ГА в детстве, может потребоваться ревакцинация во взрослом возрасте, учитывая отсутствие фактических данных или результатов математического моделирования о сохранении на протяжении десятков лет гуморального иммунитета после такой схемы вакцинации. Кроме того, хотя и считается, что стандартная двухдозовая иммунизация обеспечивает иммунитет к ВГА, сохраняющийся на протяжении десятков лет или даже пожизненно, описаны редкие случаи зараже-

ния взрослых людей из групп риска, которые были вакцинированы в детстве. У таких пациентов наличие низких уровней поствакцинальных антител не защитило от заражения большой дозой вируса, но спровоцировало селекцию генетических вариантов вируса, несущих замены в иммуногенных эпитопах, что свидетельствует об ускользании от иммунного ответа [35]. Эти случаи, редкие и для ВГА не характерные, тем не менее позволяют предположить, что сочетание исчезающего поствакци-

нального иммунитета и высокой дозы вируса может привести к прорыву ВГА-инфекции и появлению мутантных вариантов вируса. В связи с этим, последствия накопления в популяции лиц с низкими уровнями анти-ВГА в результате полученной в детстве 1 дозы вакцины не совсем очевидны. Тем не менее, эти потенциальные риски не перевешивают очевидного преимущества программ массовой вакцинации против ГА с применением 1 дозы вакцины: возможности в краткие сроки взять под контроль заболеваемость ГА, а также экономической и логистической эффективности такого подхода.

Заключение

Программы массовой вакцинации против ГА, основанные на стандартной двухдозовой схеме иммунизации, давно доказали свою эффективность, способность вызывать длительный иммунитет, сохраняющийся не менее 15 лет, и привели к контролю за ГА во многих странах. Значительно меньше данных доступно об иммунологической и эпидемиологической эффективности программ массовой вакцинации против ГА с применением 1 дозы ИАВ. Данные последних лет, полученные в разных регионах мира, в том числе в России, подтверждают эффективность такой стратегии вакцинации против ГА как с точки зрения иммунологического ответа, так и с точки зрения влияния на уровни регистрируемой заболеваемости. Однако для оценки продолжительности защиты и необходимости ревакцинации на более позднем этапе жизни необходимы дальнейшие исследования по долгосрочной эффективности стратегий вакцинации с применением 1 дозы ИАВ, а также непрерывный надзор за ГА.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Guo Y., Zhang L., Feng D., et al. The impact of universal live attenuated hepatitis A vaccines in Henan, China, 2005–2018. *Int. J. Infect. Dis.* 2020;93:163–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.02.001>
2. Stuurman A.L., Marano C., Bunge E.M., et al. Impact of universal mass vaccination with monovalent inactivated hepatitis A vaccines — A systematic review. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2017;13(3):724–36. DOI: <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1242539>
3. Lemon S.M., Ott J.J., Van Damme P., Shouval D. Type A viral hepatitis: A summary and update on the molecular virology, epidemiology, pathogenesis and prevention. *J. Hepatol.* 2017;S0168-8278(17)32278-X. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.08.034>
4. Andani A., van Damme P., Bunge E.M., et al. One or two doses of hepatitis A vaccine in universal vaccination programs in children in 2020: A systematic review. *Vaccine.* 2022;40(2):196–205. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.01.038>
5. Theeten H., Van Herck K., Van Der Meeren O., et al. Long-term antibody persistence after vaccination with a 2-dose Havrix (inactivated hepatitis A vaccine): 20 years of observed data, and long-term model-based predictions. *Vaccine.* 2015;33(42):5723–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.07.008>
6. Espul C., Benedetti L., Cuello H., et al. Persistence of immunity from 1 year of age after one or two doses of hepatitis A vaccine given to children in Argentina. *Hepat. Med.* 2012;4:53–60. DOI: <https://doi.org/10.2147/HMER.S33847>
7. Im J.H., Woo H.T., Ha B., Jung J. Effectiveness of single-dose administration of inactivated hepatitis A virus vaccination in the Republic of Korea armed forces, 2013–2016. *J. Viral. Hepat.* 2020;27(5):537–9. <https://doi.org/10.1111/jvh.13249>
8. Souto F.J.D., de Brito W.I., Fontes C.J.F. Impact of the single-dose universal mass vaccination strategy against hepatitis A in Brazil. *Vaccine.* 2019;37(6):771–5. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.12.054>
9. Mikhailov M.I., Lopatukhina M.A., Asadi Mobarhan F.A., et al. Universal single-dose vaccination against hepatitis A in children in a region of high endemicity. *Vaccines (Basel).* 2020;8(4):780. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines8040780>
10. Schmidtke P., Habermehl P., Knuf M., et al. Cell mediated and antibody immune response to inactivated hepatitis A vaccine. *Vaccine.* 2005;23(44):5127–32. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.06.022>
11. Zamir C., Rishpon S., Zamir D., et al. Control of a community-wide outbreak of hepatitis A by mass vaccination with inactivated hepatitis A vaccine. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2001;20(3):185–7. DOI: <https://doi.org/10.1007/s100960100461>
12. Iwarson S., Lindh M., Widerström L. Excellent booster response 4 to 8 years after a single primary dose of an inactivated hepatitis A vaccine. *J. Travel. Med.* 2004;11(2):120–1. DOI: <https://doi.org/10.2310/7060.2004.17079>
13. Mayorga Pérez O., Herzog C., Zellmeyer M., et al. Efficacy of virosome hepatitis A vaccine in young children in Nicaragua: randomized placebo-controlled trial. *J. Infect. Dis.* 2003;188(5):671–7. DOI: <https://doi.org/10.1086/377309>
14. Lolekha S., Pratuangtham S., Punpanich W., et al. Immunogenicity and safety of two doses of a paediatric hepatitis A vaccine in Thai children: comparison of three vaccination schedules. *J. Trop. Pediatr.* 2003;49(6):333–9. DOI: <https://doi.org/10.1093/tropej/49.6.333>
15. Bravo C., Mege L., Vigne C., Thollot Y. Clinical experience with the inactivated hepatitis A vaccine, Avaxim 80U Pediatric. *Expert. Rev. Vaccines.* 2019;18(3):209–23. DOI: <https://doi.org/10.1080/14760584.2019.1580578>
16. Herzog C., Van Herck K., Van Damme P. Hepatitis A vaccination and its immunological and epidemiological long-term effects — a review of the evidence. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2021;17(5):1496–519. DOI: <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1819742>
17. Abadia I., Wong D., Rengifo A., et al. Eight years follow-up of the immune response in children after one or two doses of inactivated hepatitis A vaccine in Panama. In: *International Pediatric Association (IPA 2019) Congress – 17 to 21 March 2019*. Panama City, Panama; 2019.
18. Espul C., Benedetti L., Linares M., et al. Seven-year follow-up of the immune response after one or 2 doses of inactivated hepatitis A vaccine given at 1 year of age in the Mendoza Province of Argentina. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2017;13(11):2707–12. DOI: <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1358326>
19. Vacchino M.N. Incidence of Hepatitis A in Argentina after vaccination. *J. Viral. Hepat.* 2008;15(Suppl. 2):47–50. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2008.01029.x>
20. Vizzotti C., González J., Rearte A., et al. Single-dose universal hepatitis A immunization in Argentina: low viral circulation and high persistence of protective antibodies up to 4 years. *J. Pediatric Infect. Dis. Soc.* 2015;4(4):e62–e67. DOI: <https://doi.org/10.1093/jpids/piu068>
21. Gentile A. The need for an evidence-based decision-making process with regard to control of hepatitis A. *J. Viral. Hepat.* 2008;15(Suppl. 2):16–21. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2008.01023.x>

22. WHO position paper on hepatitis A vaccines – June 2012. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2012;87(28/29):261–76.
23. Urueña A., González J.E., Rearte A., et al. Single-dose universal hepatitis A immunization in one-year-old children in Argentina: High prevalence of protective antibodies up to 9 years after vaccination. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2016;35(12):1339–42. DOI: <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001322>
24. Urueña A., Badano M.N., Baré P., et al. Humoral and cellular immune memory response 12 years following single dose vaccination against hepatitis A in Argentinian children. *Vaccine.* 2022;40(1):114–21. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.11.037>
25. de Brito W.I., de Oliveira R.M., Silva J., et al. Persistence of immunity against hepatitis A in Brazilian children vaccinated with a single dose of inactivated virus vaccine. *J. Viral. Hepat.* 2023;30(7):615–20. DOI: <https://doi.org/10.1111/jvh.13819>
26. Brito W.I., Alves-Junior E.R., Oliveira R.M., Souto F.J.D. Initial evaluation of universal immunization with a single dose against hepatitis A virus in Central Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* 2018;22(3):166–70. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2018.04.001>
27. Lopatukhina M.A., Kyuregyan K.K., Karlsen A.A., et al. The immunological and epidemiological effectiveness of pediatric single-dose vaccination against hepatitis A 9 to 11 years after its implementation in the Tyva Republic, the Russian Federation. *Vaccines (Basel).* 2024;12(8):907. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines12080907>
28. Raczniak G.A., Thomas T.K., Bulkow L.R., et al. Duration of protection against hepatitis A for the current two-dose vaccine compared to a three-dose vaccine schedule in children. *Vaccine.* 2013;31(17):2152–5. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.02.048>
29. Vizzotti C., González J., Gentile A., et al. Impact of the single-dose immunization strategy against hepatitis A in Argentina. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2014;33(1):84–8. DOI: <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000042>
30. Попова О.Е., Кюрегян К.К., Ильченко Л.Ю. и др. Эпидемиологический и молекулярно-биологический анализ причин подъема заболеваемости гепатитом А в Республике Тыва в 2008 году. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2010;(3):23–6. Popova O.E., Kiuregyan K.K., Il'chenko L.Yu., et al. Epidemiological and molecular biological analysis of causes of rise of hepatitis A incidence in Republic of Tyva in 2008. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2010;(3):23–6.
31. Blanco Fernández M.D., Torres C., Riviello-López G., et al. Analysis of the circulation of hepatitis A virus in Argentina since vaccine introduction. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012;18(12):E548–51. DOI: <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12034>
32. Yanez L.A., Lucero N.S., Barril P.A., et al. Evidence of hepatitis A virus circulation in central Argentina: seroprevalence and environmental surveillance. *J. Clin. Virol.* 2014;59(1):38–43. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.11.005>
33. Fantilli A., Cola G.D., Castro G., et al. Hepatitis A virus monitoring in wastewater: a complementary tool to clinical surveillance. *Water Res.* 2023;241:120102. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.120102>
34. Jeong S.H., Lee H.S. Hepatitis A: clinical manifestations and management. *Intervirology.* 2010;53(1):15–9. DOI: <https://doi.org/10.1159/000252779>
35. Sabrià A., Gregori J., García-Cehic D., et al. Evidence for positive selection of hepatitis A virus antigenic variants in vaccinated men-having-sex-with men patients: implications for immunization policies. *EBioMedicine.* 2019;39:348–57. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.11.023>

Информация об авторах

Лопатухина Мария Александровна  — н. с. лаб. молекулярной эпидемиологии вирусных гепатитов ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия; н. с. лаб. вирусных гепатитов НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, lopatukhina@cmd.su, <https://orcid.org/0000-0001-6853-4154>

Кюрегян Карен Каренович — д-р биол. наук, профессор РАН, зав. лаб. молекулярной эпидемиологии вирусных гепатитов ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия; в. н. с. лаб. вирусных гепатитов НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия; профессор каф. вирусологии Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования, Москва, Россия, karen-kyuregyan@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3599-117X>

Михайлов Михаил Иванович — д-р мед. наук, акад. РАН, г. н. с. лаб. молекулярной эпидемиологии вирусных гепатитов ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия; зав. лаб. вирусных гепатитов НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия; профессор каф. эпидемиологии Белгородского государственного национального исследовательского университета, Белгород, Россия, michmich2@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6636-6801>

Участие авторов: Лопатухина М.А. — написание статьи, подготовка и оформление рисунков; Кюрегян К.К. — написание и редактирование статьи, создание и оформление рисунков; Михайлов М.И. — концепция, идея 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.

Information about the authors

Mariya A. Lopatukhina  — researcher, Laboratory of molecular epidemiology of viral hepatitis, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia; researcher, Laboratory of viral hepatitis, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, lopatukhina@cmd.su, <https://orcid.org/0000-0001-6853-4154>

Karen K. Kyuregyan — Dr. Sci. (Biol.), Professor of the RAS, Head, Laboratory of molecular epidemiology of viral hepatitis, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia; leading researcher at the Laboratory of viral hepatitis, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, karen-kyuregyan@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3599-117X>

Mikhail I. Mikhailov — Dr. Sci. (Med.), Full Member of the RAS, chief researcher, Laboratory of molecular epidemiology of viral hepatitis, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia; Head, Laboratory of viral hepatitis, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia; Professor, Department of epidemiology, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, michmich2@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6636-6801>

Authors' contribution: Lopatukhina M.A. — writing of the article, preparing and designing the figures; Kyuregyan K.K. — writing and editing of the article, creating and designing the figures; Mikhailov M.I. — conceptualization, idea of the article, editing of the article. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a substantial contribution to the conception of the article, acquisition, analysis, interpretation of data for the article, drafting and revising the article, final approval of the version to be published.

The article was submitted 21.05.2025;
accepted for publication 30.07.2025;
published online 11.08.2025

Статья поступила в редакцию 21.05.2025;
принята к публикации 30.07.2025;
опубликована online 11.08.2025



Защитные перчатки нового поколения: актуальные тенденции технологических решений и перспективы применения (научный обзор)

Захарова Ю.А.^{1✉}, Новиков В.А.¹, Андреев С.В.¹, Макарова М.А.^{2,3}

¹Федеральный научный центр гигиены имени Ф.Ф. Эрисмана, Москва, Россия;

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

³Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация

Введение. Защитные перчатки широко используют в медицине, они обеспечивают уровень биологической защиты пациентов и медицинского персонала. Вместе с тем существует риск развития инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, у сотрудников и пациентов при их ненадлежащем применении. Значимой проблемой является рост медицинских отходов и их утилизация. В этой связи разработка новых подходов к обеспечению максимальной защиты персонала и пациентов, минимизации риска инфицирования, благодаря созданию защитных перчаток на основе биоразлагаемых полимерных материалов с антимикробным покрытием, является актуальной эпидемиологической и экологической задачей.

В статье обсуждаются современные технологии и возникающие проблемы при получении новых материалов для создания защитных перчаток с антимикробными свойствами при использовании производных гуанидина, четвертичных аммониевых соединений, хлорированных фенолов, эфирных масел, соединений йода, солей серебра, частиц и наночастиц металлов и их оксидов, экстрактов растительных масел, анилиновых красителей. Введение таких бионаполнителей, как крахмал и наноцеллюлоза, будет способствовать улучшению биоразлагаемых свойств при сохранении необходимых физико-химических характеристик. Разработка новых композитных материалов с улучшенными характеристиками биodeградации в форме термопластичных эластомеров, полилактида и поликапролактона позволит решить проблему утилизации отходов из синтетического каучука.

Заключение. Анализ современной научной литературы определил высокий интерес в мире к созданию защитных перчаток с антимикробными свойствами на основе биоразлагаемых материалов. Однако их применение, кроме непосредственного подавления роста патогенной микрофлоры, может дополнительно нести ряд проблем, связанных с влиянием на здоровье человека и экосистему. Для успешной реализации данного направления важно продолжать научные исследования по приданию перчаткам заявленных свойств с использованием эффективных, надёжных и безопасных технологий с разработкой унифицированных методик и протоколов оценки антимикробной активности для последующего широкого внедрения в практику. Создание биоразлагаемых защитных перчаток имеет большие перспективы, поскольку будет способствовать снижению риска распространения инфекций в медицинских организациях и внесёт существенный вклад в охрану окружающей среды.

Ключевые слова: защитные перчатки, антимикробные свойства, функциональные материалы, научный обзор, биоразлагаемые компоненты

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: Захарова Ю.А., Новиков В.А., Андреев С.В., Макарова М.А. Защитные перчатки нового поколения: актуальные тенденции технологических решений и перспективы применения (научный обзор). *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2025;102(5):635–646.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-715>

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

Review

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-715>

Next-Generation Protective Gloves: Current Trends in Technological Solutions and Application Prospects (Scientific Review)

Yulia A. Zakharova^{1✉}, Vyacheslav A. Novikov¹, Sergey V. Andreev¹, Mariia A. Makarova^{2,3}

¹F.F. Erisman Federal Scientific Center of Hygiene, Moscow, Russia;

²Saint-Peterburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia;

³North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia

Abstract

Introduction. Protective gloves are widely used in medicine to provide biological protection for patients and medical staff. However, if gloves are used improperly, there is a risk of healthcare-associated infections (HAIs) for both staff and patients. A significant problem is the resulting growth in medical waste and its disposal. Therefore, developing new approaches to ensure maximum protection for staff and patients, and minimize the risk of infection, by creating protective gloves based on biodegradable polymer materials with an antimicrobial coating, is an urgent epidemiological and environmental objective.

This paper discusses modern technologies and emerging issues in the creation of new materials for protective gloves with antimicrobial properties. These materials can be made using guanidine derivatives, quaternary ammonium compounds (QACs), chlorinated phenols, essential oils, iodine compounds, silver salts, metal oxides and metal nanoparticles and oxides, vegetable oil extracts, aniline dyes. The introduction of biofillers such as starch and nanocellulose will help improve biodegradability. They will also help maintain the necessary physical and chemical characteristics. The problem of synthetic rubber waste disposal can be solved by the development of new composite materials with improved biodegradation characteristics. These materials are in the form of thermoplastic elastomers (TPE), polylactide (PLA) and polylactone (PLC).

Conclusion. A review of the scientific literature revealed a significant global interest in the creation of protective gloves with antimicrobial properties made from biodegradable materials. However, in addition to directly suppressing the growth of pathogenic microflora, their use may also pose a number of problems related to their impact on human health and the ecosystem. The successful implementation of this direction hinges on the continuation of scientific research on imparting the declared properties to gloves. This research should use effective, reliable and safe technologies, as well as the development of unified methods and protocols for assessing antimicrobial activity. Once these are in place, the research can be implemented widely in practice. The production of biodegradable protective gloves offers significant potential, as it will help to reduce the risk of infection spreading in healthcare organizations and contribute to environmental protection.

Keywords: *protective gloves, antimicrobial properties, functional materials, review, biodegradable components*

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: Zakharova Yu.A., Novikov V.A., Andreev S.V., Makarova M.A. Next-generation protective gloves: current trends in technological solutions and application prospects (scientific review). *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(5):635–646.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-715>

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

Введение

Развитие человеческого потенциала и охрана окружающей среды являются важными задачами, определяющими внутреннюю политику государства, и требуют совершенствования комплекса мер по созданию условий для укрепления здоровья граждан, увеличения ожидаемой продолжительности жизни, снижения смертности, профилактики инфекционных болезней, включая инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП),

которые Указом Президента Российской Федерации определены в качестве биологической угрозы¹.

ИСМП являются одной из ключевых проблем мирового здравоохранения [1, 2]. Каждый день от 7 до 15 пациентов из 100 приобретают их в стационаре.

¹ Указ Президента РФ от 11.03.2019 № 97 «Об Основах государственной политики Российской Федерации в области обеспечения химической и биологической безопасности на период до 2025 года и дальнейшую перспективу».

наре, каждый 10-й умирает². Наибольшую значимость вопросы профилактики ИСМП традиционно имеют в учреждениях родовспоможения [3, 4] и в хирургических стационарах [5]. Актуальность возрастает в связи со сложной демографической ситуацией, а также ростом стихийных бедствий, техногенных катастроф и военных конфликтов. В формировании эпидемических очагов ИСМП, кроме бактериальных патогенов, устойчивость которых к антимикробным препаратам и биоцидам приобрела глобальный характер, растёт роль вирусов, включая респираторные [6] и кишечные [7]. Остаётся высокой значимость возбудителей гемоконтактных вирусных инфекций [8]. Перечисленное выше предполагает усиление мер неспецифической профилактики ИСМП, в частности, совершенствование средств индивидуальной защиты.

Современные проблемы использования защитных перчаток в медицине

Защитные перчатки являются важнейшим атрибутом каждого медицинского работника. Как средства индивидуальной защиты (СИЗ) одноразового применения они предназначены для создания барьера между пациентом и медицинским персоналом при выполнении профессиональных обязанностей. Медицинские перчатки, кроме основных защитных свойств (непроницаемость для микроорганизмов, герметичность, прочность, безопасность для здоровья пациента и персонала), должны обладать удовлетворительными потребительскими свойствами (удобство/комфортность, качественная упаковка и маркировка, простота утилизации, функциональность)³.

В зависимости от степени инвазивности медицинских манипуляций и риска инфицирования пациента защитные перчатки делят на хирургические и диагностические/смотровые. Хирургические перчатки должны быть стерильными. Диагностические/смотровые перчатки могут быть стерильными или нестерильными. Нестерильные перчатки используют в качестве мер стандартной предосторожности при работе с пациентами, инфицированными и/или колонизированными резистентными штаммами микроорганизмов, и лицами, инфицированными вирусами — возбудителя-

ми гемоконтактных инфекций (вирусы гепатитов В и С, ВИЧ и др.).

В зависимости от материала защитные перчатки делят на латексные, синтетические и комбинированные. В настоящее время большинство производителей защитных перчаток используют в качестве основы природный или синтетический латекс [9]. Изделия из натурального латекса (резины) производят из сока растения *Hevea brasiliensis*, они более комфортны [10–12]. В России преимущественно используют латексные перчатки. Материал дает чувство удобства при контакте с кожей рук, что обеспечивается его высокой эластичностью и способностью абсорбировать пот. Несмотря на положительные свойства, натуральный латекс часто вызывает аллергические реакции — до 25% медсестёр, использующих латексные перчатки, отмечают у себя симптомы дерматита [13]. В связи с этим большинство медицинских работников предпочитают перчатки из синтетических материалов: винила, неопрена, полиуретана и нитрила. Они более прочные и стойкие к воздействию химических веществ, при этом более тонкие, что обеспечивает высокую чувствительность пальцев рук. Чаще других используют перчатки из нитрила, реже — из поливинилхлорида и полихлоропрена [14, 15]. Такие перчатки не имеют пор, однако уступают латексным в прочности и эластичности, их целостность, в противоположность латексным, не восстанавливается при микрповреждениях.

Одна из разновидностей перчаток повышенной прочности — кольчужные. В нашей стране их используют до сих пор, но они защищают только от порезов, а не от проколов. В этой связи в европейских лечебных организациях и в современных российских клиниках в практику входят двойные перчатки. При их использовании риск контакта рук хирурга с кровью пациента сокращается с 70 до 2%, а при перфорации внешней перчатки внутренняя остается неповреждённой в 87% случаев [16]. При использовании двух пар перчаток, надетых одна поверх другой, кожа значительно лучше защищена от попадания крови, чем при применении одинарных перчаток. Вместе с тем обнаружить повреждения в двойных перчатках так же сложно, как в одинарных.

В 1993 г. на европейском рынке появились двойные перчатки с индикацией прокола, получившие к настоящему времени широкое распространение. Принцип достаточно прост, но эффективен. Нижняя перчатка отличается от верхней по цвету. Жидкость (кровь, промывные воды и пр.) при повреждении наружной перчатки оказывается между перчатками, и в области прокола образуется контрастное пятно, которое сигнализирует о перфорации. Таким образом, при использовании перчаток с индикацией выявляется до 97% проколов, а при использовании одного слоя перчаток — лишь 8% [16].

² WHO launches first ever global report on infection prevention and control. 2022. URL: <https://www.who.int/news/item/06-05-2022-who-launches-first-ever-global-report-on-infection-prevention-and-control> (дата обращения: 06.05.2022).

³ МР 3.5.1.0113-16 «Использование перчаток для профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в медицинских организациях» (утв. Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А.Ю. Поповым 02.09.2016).

В зависимости от вида материала перчатки должны соответствовать разным стандартам. Для нитриловых смотровых перчаток это стандарт ASTM D6319-19 «Standard Specification for Nitrile Examination Gloves for Medical Application», для смотровых перчаток из натурального латекса — ASTM D3578-19 «Standard Specification for Rubber Examination Gloves», для перчаток из поливинилхлорида — ASTM D5250-19 «Standard Specification for Poly(vinyl chloride) Gloves for Medical Application». В стандарте EN 374-2:2014 «Protective gloves against dangerous chemicals and microorganisms — Part 2: Determination of resistance to penetration, IDT» представлен метод оценки на проницаемость микроорганизмами, обеспечивающий минимальный уровень защиты 2 (перчатка, устойчивая к проникновению воздуха и воды, прошедшая испытания на утечку, считается устойчивой к микроорганизмам). Обновлённый стандарт ввёл новые требования к проведению испытаний по оценке защиты от вирусов (в дополнение к грибкам и бактериям), ISO 16604 — к оценке защиты от контакта с кровью и биологическими жидкостями как готового изделия, так и самого материала.

Ни один из видов перчаток не является абсолютно непроницаемым для микроорганизмов. Проникновение инфекционного агента внутрь перчаток может происходить через микротравмы и поры, размеры которых сопоставимы с размерами микроорганизмов. Попавшая внутрь перчаток жидкость чаще локализуется в области большого пальца и на кончиках пальцев, и только в 30% случаев эти дефекты замечаются пользователями. Среднестатистическая частота таких «незамеченных» проколов во время хирургических вмешательств составляет 34,7–92% [17]. Частота повреждений хирургических перчаток во время ортопедических операций может достигать 26,1%, при этом в 82% случаев они остаются незамеченными [18]. Имеют место различия в частоте проколов перчаток у врачей и медсестёр. Так, из 1457 обследованных перчаток врачей повреждёнными оказались 17,3%, а из 325 сестринских — 23,7% [19].

Несмотря на то что современные технологии позволили существенно улучшить механические свойства перчаток, даже их двойное использование (две перчатки на одной руке) не может исключить проникновение микроорганизмов при проколах и других механических повреждениях. М.Н. Bardorf и соавт. провели оценку влияния в случае прокола защитных свойств хирургических перчаток из таких материалов, как латекс, нитрил, неопрен [20]. Установлено, что проникновение микроорганизмов зависело от жёсткости или эластичности материала. В работе А.Н. Goldman и соавт. более 50% (из 33 пар) наружных перчаток при ортопедических операциях имели макро- или микроперфорации по

причине контакта с хирургическими вращающимися инструментами (сверла) [21]. А. Wolfensberger и соавт. отмечали, что в 14% случаев микроорганизмы попадали на руки с перчаток при их снятии [22]. В этой связи при выборе типа хирургических перчаток необходимо принимать во внимание особые условия видов оперативных вмешательств, которые могут быть удовлетворены за счёт дополнительных свойств перчаток.

Производителями медицинских изделий предложены для внедрения в практику как высокоэффективная мера перчатки с внутренним антибактериальным покрытием. Защитный механизм одной из разновидностей таких перчаток базируется на технологии активного покрытия, содержащего в составе хлоргексидина биглюконат с широким спектром антимикробного действия [23].

Серьёзная ошибка, которую часто допускает медицинский персонал, работая в перчатках (прежде всего в опудренных), — обработка их спиртовыми растворами. Доля сотрудников, которые не меняют перчатки, обрабатывая их спиртом, или меняют перчатки лишь при контакте с кровью, согласно опросам (анкетированию) составляет 6,5% [24]. Известно, что спиртовые растворы разрушают верхний защитный слой перчаток, делая их проницаемыми для микроорганизмов и образуя «компресс» из пудры в виде смеси кожного антисептика и «перчаточного сока», что может привести к послеоперационным спаечным образованиям у пациента и отрицательно влиять на заживление раны. Пудра с перчаток сотрудника лаборатории, попав в биологическую пробу, также может привести к ложноотрицательным результатам при исследовании сыворотки крови на ВИЧ [16].

Перчатки не рекомендуется обрабатывать антисептическими и дезинфицирующими средствами, что подтверждено экспериментальными исследованиями. Установлено проникновение *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* через латексные медицинские перчатки без антисептика через 30 мин — в 15% случаев, через 60 мин — в 25%, а через перчатки тех же видов, но обработанных антисептиком, — в 29,2 и 45,5% соответственно [25].

Важной проблемой остаются случаи мытья рук в перчатках с мылом персоналом в промежутках между оказанием помощи разным пациентам или между проведением манипуляций с одним и тем же пациентом, что не рекомендовано, однако на практике происходит довольно часто. Руки также могут соприкасаться с потенциально загрязнённой внешней поверхностью перчаток во время их снятия. Проведённые А.Р. Tenorio и соавт. исследования в отношении ванкомицин-резистентных энтерококков установили, что, несмотря на использование перчаток, эти патогены обнаруживали на руках персонала после снятия перчаток в 30% случаев [26].

Перечисленное выше позволило сделать вывод о недостаточной эффективности защиты рук медицинского персонала и пациентов при использовании современных видов защитных перчаток и необходимости дополнительного внесения в их состав антимикробных компонентов. Рост числа устойчивых к антибиотикам и дезинфицирующим средствам микроорганизмов диктует необходимость поиска новых антимикробных наполнителей, к которым в меньшей степени будет развиваться резистентность. Прежде всего речь идёт об отделениях стационаров с высокой циркуляцией внутрибольничных штаммов микроорганизмов, где применение защитных перчаток с антимикробным эффектом будет наиболее востребованным.

Рост объёмов медицинских отходов как ведущая экологическая проблема

В медицинских организациях одноразовые перчатки после использования подлежат обеззараживанию/обезвреживанию как медицинские отходы соответствующего класса (как правило, классов Б или В, в некоторых случаях Г или Д)⁴. Представляя эпидемиологическую опасность, медицинские отходы являются куда более значимой угрозой, чем большинство иных отходов производства и потребления [27]. Изменение методов диагностики и лечения пациентов, резкий рост спроса на медицинский инструментарий одноразового применения существенно повлияли на морфологический состав больничных отходов, скорость их формирования и накопления.

Медицинские отходы сложны и разнообразны, многие их компоненты являются опасными по микробиологическому составу. Важным является не только санитарно-эпидемиологическая безопасность, но и экономическая эффективность их обеззараживания/обезвреживания. Обеспечение эпидемиологической и экологической безопасности обращения с медицинскими отходами требует активного межведомственного взаимодействия и правового регулирования [28].

По данным ВОЗ, образование медицинских отходов в мире возрастает ежегодно и к 2021 г. уже составило 2,27 кг на человека в день. В развивающихся странах медицинских отходов образуется в 2–3 раза больше, чем в развитых странах [29]. По

данным агентства по охране окружающей среды США, около 20% медицинских отходов формируются в больницах, 15% — в лабораториях, 35% — в домах престарелых, 30% — в клиниках первой помощи и других учреждениях здравоохранения⁵. Наряду с этим в 2020 г., как отмечено в докладе ООН, в развитых странах мира в 30% медицинских учреждений, а в наименее развитых в 60% отсутствовало оборудование для утилизации отходов [30]. В России в 2021 г. образовалось порядка 8,448 млрд т отходов [31], из них 3,5 млн т — медицинских [32].

Использование СИЗ на основе синтетических материалов (полипропилен, полиуретан и полиакрилонитрил в масках, а также латекс, винил, полиэтилен и нитрил в перчатках) представляет собой серьёзную экологическую проблему загрязнения окружающей среды в виде не только твёрдых отходов, но и пластиковых частиц, образовавшихся в результате их фрагментации. Эти частицы не поддаются биологическому разложению, могут длительное время оставаться в окружающей среде и представлять серьёзную опасность для представителей водной и наземной фауны и флоры. Так, по подсчётам специалистов, только количество одноразовых масок для лица, которые попали в Мировой океан в 2020 г., оценивалось в 1,56 млрд единиц [33].

Прогресс медицинских технологий неизбежен, однако влечёт значительные объёмы увеличения медицинских отходов. В этой связи ведётся поиск как новых технологий обезвреживания и уничтожения, так и принципов управления количеством отходов. Открытое сжигание медицинских отходов или сжигание иным ненадлежащим способом приводят к выбросу диоксинов, фуранов и твёрдых частиц в воздух, загрязняя окружающую среду [34].

В этой связи задача по приданию защитным перчаткам не только антимикробных свойств, но и максимально возможных биоразлагаемых компонентов является одним из важных профилактических и экологических направлений по минимизации рисков возникновения и распространения инфекционных болезней, сохранения здоровья населения в условиях безопасной и комфортной среды обитания.

Новые материалы для получения перчаток с антимикробными свойствами

Антимикробные компоненты, которые могли бы быть включены в состав материала защитных перчаток из натурального или синтетического каучука, представлены производными гуанидина (соли хлоргексидина и полигексаметилен бигуанида),

⁴ Раздел X СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» (утв. Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А.Ю. Поповой 28.01.2021).

⁵ National Overview: Facts and Figures on Materials, Wastes and Recycling / US EPA. <https://www.epa.gov/facts-and-figures-about-materials-waste-and-recycling/national-overview-facts-and-figuresmaterials> (дата обращения: 29.04.2023).

солями четвертичных аммониевых соединений, хлорированными фенолами (триклозан), эфирными маслами (фарнезол, феноксиэтанол, октоксиглицерин), соединениями йода, солями серебра, наночастицами металлов и их оксидов, а также экстрактами некоторых растительных масел (горечавка фиолетовая), анилиновыми красителями (бриллиантовый зелёный), соединениями на основе хитозана, куркумы и подобными веществами [35]. Ковалентно связывая антибактериальный агент с полимерными поверхностями, можно добиться стойкого эффекта и «самообеззараживания» материала. Как вероятные антимикробные компоненты рассматриваются металлы и их оксиды, в частности частицы серебра, оксида цинка, меди, а также композитные материалы на их основе [36–38].

В работе X. Chen и соавт. для придания натуральному латексу антимикробных свойств в его состав (до вулканизации) были добавлены вис커еры карбоната кальция (CaCO₃), тетраподоподобные вис커еры оксида цинка (T-ZnO), а также вис커еры оксисульфата магния в виде игл и частиц произвольной формы (MgOSw) [39]. Антимикробную активность изучали методом Оксфордской чашки и суспензионным методом. В качестве тест-микроорганизмов использовали *E. coli*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и *S. epidermidis*. Наилучшие результаты в отношении всех микроорганизмов были получены для образцов, содержащих оксид цинка. Несколько ниже отмечали антимикробную активность у материалов, содержащих карбонат кальция. Образцы на основе оксисульфата магния проявили антимикробный эффект лишь в отношении *P. aeruginosa*. Полученные результаты подтвердили тот факт, что T-ZnO активизирует активную окислительную группу (ОН), приводящую к гибели микроорганизмов.

E. Smiechowicz и соавт. предложили использовать для создания защитных перчаток целлюлозное волокно [40]. В состав волокон были введены наночастицы кремния с иммобилизованными наночастицами серебра. Авторы ограничились лишь результатами физико-химических свойств материала (прочность, паропроницаемость, устойчивость к механическому воздействию и изменению pH), не указав антимикробную активность.

В работе T. Agrornwichanor и соавт. установлен частичный антимикробный эффект добавки к натуральному латексу в виде N,N,N-триметилхитозана, сорбированного на поли(метилметакрилате) и стабилизированного наночастицами кремния в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов [41]. Выраженное антимикробное действие данной композиции было установлено лишь для грамположительного *S. aureus*.

Оксид графена, а также его производные обладают широким спектром противовирусного

действия в отношении ДНК- и РНК-содержащих вирусов, включая оболочечные и безоболочечные вирусы. Материалы на основе графена, индуцированные лазером, демонстрировали антибактериальные свойства [42]. Исследования эффективности их применения до настоящего времени проводились исключительно в лабораторных условиях, а данные литературы, подтверждающие эффективность при апробации в практических условиях, отсутствуют.

Высокие антибактериальные свойства выявлены при введении в натуральный латекс частиц серебра, осаждённых на оксиде графена. Антимикробную активность композитных материалов T. Li и соавт. оценивали по площади зон задержки роста культур тест-микроорганизмов *E. coli* и *S. aureus* в эксперименте с этими добавками [43]. Синтезированные материалы продемонстрировали высокую антибактериальную активность, вместе с тем, авторам так и не удалось установить связь между величиной зон задержки роста и концентрацией синтезированной добавки. Механизм антимикробного действия при этом объясняли активным выделением ионов серебра Ag⁺ и их взаимодействием с тиольными SH-группами в составе белковых молекул микроорганизмов.

L.A. Alshabanah и соавт. провели исследования полимерного композитного материала, в составе которого также присутствовали наночастицы серебра размером 17–51 нм [44]. В качестве матрицы выбран поливиниловый спирт или термопластичный полиуретан. Антимикробные свойства оценивали аналогично по зонам задержки роста микроорганизмов (*S. aureus* и его метициллин-резистентный вариант (MRSA), *E. coli*, *Acinetobacter baumannii* и *Klebsiella pneumoniae*). Установлена высокая антимикробная активность материала на основе полиуретана с содержанием 4% наночастиц серебра в отношении всех тестируемых штаммов.

M. Kahar Bador и соавт. описали способ придания нитриловым перчаткам антимикробных свойств за счёт нанесения на их поверхность полигексаметиленбигуанид гидрохлорида [45]. Оценку эффективности проводили с привлечением медицинского персонала из отделения интенсивной терапии. Определяли количество выросших на питательном агаре колониеобразующих единиц (КОЕ/мл) микроорганизмов в результате посева проб (смывы с перчаток) после выполнения персоналом четырех манипуляций (внутривенное введение раствора, уход за полостью рта пациента, проведение физиотерапевтических процедур, смена постельного белья). Исследования проводили параллельно с использованием стандартных нитриловых перчаток без полигексаметиленбигуанид гидрохлорида (контроль). В первых трех из четырех видов манипуляций антибактериальные перчатки имели менее выраженное бактериальное загрязнение относительно

контроля. При смене постельного белья существенная разница в бактериальной контаминации перчаток в группах не наблюдалась.

S. Ali и соавт. изучали влияние антимикробного действия полигексаметиленбигуанид гидрохлорида на выживаемость *Streptococcus pyogenes*, карбапенем-резистентной *E. coli*, MRSA и *K. pneumoniae* [46]. Через 15 мин после нанесения на необработанные перчатки (1 см²) суспензии (10 мкл), содержащей 10⁴ КОЕ/мл бактериальной культуры, независимо от типа загрязнения, перечисленные бактерии сохраняли исходный уровень концентрации. Перчатки, обработанные полигексаметиленбигуанид гидрохлоридом, снижали уровень микробной контаминации на 99,99% в течение 10 мин контакта. Однако антимикробные свойства таких перчаток имели сильную зависимость от наличия биологических загрязнений (кровь, органические соединения и пр.).

В работе M. Suchomel и соавт. изучено влияние хлоргексидин биглюконата на выживаемость микроорганизмов кожи рук хирургов после ношения перчаток в течение 3 ч [47]. Предварительно руки обрабатывали кожным антисептиком, содержащим 60% (об.) *n*-пропанола. Ношение хирургических перчаток, содержащих хлоргексидин биглюконат, приводило к снижению количества микрофлоры на 2,67 lg. При необработанных перчатках степень снижения была менее выражена (от 1,96 lg до 1,68 lg, $p \leq 0,01$).

J. Leitgeb и соавт. в аналогичном исследовании (с хлоргексидин биглюконатом) установили высокую степень антимикробной защиты рук спустя 2 ч ношения перчаток [48]. В эксперименте принимали участие 16 здоровых взрослых добровольцев. Они надевали на одну руку перчатку с хлоргексидин биглюконатом (опыт), на другую — без него (контроль), после 2 ч ношения выполняли определённые движения пальцами, снимали перчатки с рук. В дальнейшем на внутреннюю поверхность срезаемых у перчаток пальцев наносили тест-микроорганизмы *S. aureus* (ATCC 6538) или *K. pneumoniae* (ATCC 4352) в количестве 10⁸ КОЕ/мл. Основным критерием оценки считали среднее количество жизнеспособных форм, выраженное в КОЕ, после 5-минутного контакта с тест-микроорганизмами. В пробах перчаток, обработанных хлоргексидин биглюконатом, среднее количество *S. aureus* оказалось ниже относительно контрольной группы на 6,24 lg, а *K. pneumoniae* — на 6,22 lg.

Эффективной добавкой к натуральному латексу являются четвертичные аммониевые соединения. A. Arakkal и соавт. установили, что введение в состав полимерного прекурсора четвертичного поли(4-винилпиридина) обеспечивало необходимую степень защиты (99,99%) в отношении клинических изолятов *P. aeruginosa* (PAO1) и *A. baumannii* (C80) [49].

В нескольких научных работах W. Моораяк и соавт. для придания перчаткам антимикробных свойств использовали кожуру мангостана [50]. В качестве активных компонентов выступали ксантоны — вторичные метаболиты, встречающиеся также в растениях, грибах и лишайниках. Ксантонам приписывают антиоксидантные, противораковые, противовоспалительные, противоаллергические, антибактериальные, противогрибковые и противовирусные свойства. В качестве бионаполнителя применяли натуральную резину. Добавление порошка кожуры мангостана улучшало антимикробные свойства резиновых перчаток без ущерба их физико-механическим характеристикам. При этом токсичность материала была существенно ниже относительно экземпляров с нитратом серебра.

Композитный материал на основе порошка мангостана и оксида цинка описан M. Luengchavanon и соавт. [51]. Антимикробный компонент был нанесён на поверхность обычных нитриловых перчаток. Минимальная ингибирующая концентрация для MRSA составила 160 мкг/мл. Установлено высокое ингибирующее действие в отношении *K. pneumoniae*. Несмотря на высокую эффективность представленного авторами способа, для достижения эффекта потребовался длительный контакт микроорганизмов с поверхностью — не менее 30 мин, что в реальных условиях труднодостижимо.

Одним из перспективных антимикробных компонентов растительного происхождения считается экстракт алоэ. H. Khanzada и соавт. в эксперименте установили методом электроспиннинга высокую антимикробную эффективность волокон поливинилацетата с экстрактом алоэ в отношении *S. aureus* и *E. coli* [52].

Введение в состав перчаток антимикробных добавок может способствовать в ряде случаев расширению их функциональных возможностей. Так, C. Salvadores Fernandez и соавт., нанеся на нитриловые перчатки композитный материал, содержащий оксид цинка, и интегрируя в материал перчаток гибкие электрические контакты, получили на кончиках пальцев сверхчувствительный слой, который, как заявляют авторы, может быть использован в качестве инструмента диагностики [53]. Они успешно применили такие перчатки для исследования повреждения сфинктера свиньи в эксперименте *ex vivo*.

Новый подход к созданию «самоочищающихся» защитных перчаток, основанный на действии электрического тока в результате трения нейлона и силиконовой резины, предложен S. Bayan и соавт. [54]. Небольшое биоэлектрическое устройство (2 × 2 см), состоящее из силиконовой резины и нейлона (нанесённых на нитрил), генерировало более 20 В переходного напряжения или 41 мкВт выходной мощности, что было достаточно для

зарядки конденсатора до 65 В всего за ~ 50 с. При этом выделяющаяся энергия была использована для уничтожения микроорганизмов, попадающих на поверхность. Так, для снижения количества *P. aeruginosa* и *E. coli* эффективность метода составила 50–70%.

Е.М. Klupp и соавт. изучили антимикробную активность смотровых перчаток со светоактивируемыми свойствами [55]. Эксперимент проведён в практических условиях в отношении грамположительных микроорганизмов. Контаминацию поверхностей перчаток в соответствии со стандартизированной методикой (ASTM D7907) проводили суспензией *Enterococcus faecium* (ATCC 6057) и его ванкомицин-резистентным вариантом, а также MRSA (ATCC 43300). Результаты свидетельствовали о недостаточной активности применяемого способа в отношении используемых штаммов. Уровень снижения контаминации составлял менее $1 \log_{10}$ при экспозиции воздействия света 10 мин. Авторы пришли к выводу о неэффективности метода.

В работе D. Patil и соавт. описан способ придания нитрилу антимикробных свойств без добавления действующего вещества [56]. На поверхности перчаток методом реактивного ионного травления был создан определённый нанотопографический рисунок, напоминающий крыло цикады. Изменённая структура поверхности приводила к гибели более 85% изолятов *P. aeruginosa*, при этом эффективность антимикробного свойства такого материала имела чёткую зависимость от структуры поверхности.

Современные подходы к созданию биоразлагаемых защитных перчаток

Полимерные материалы, в том числе синтетический каучук, требуют значительного времени для разложения в природных условиях — около 3 лет [57]. Одной из причин длительного пребывания в окружающей среде в неизменённом виде является синтетическое происхождение каучуков, для производства которых используется сырьё из ископаемого топлива. Разнообразие мономеров, применяемых для синтеза каучука, привело к созданию множества видов синтетических каучуков, однако их утилизация по-прежнему затруднена. Управление отходами резиновых изделий в конце их жизненного цикла представляет глобальную экологическую проблему современности.

На скорость разложения в природе перчаток, как и любых других материалов, оказывают влияние многочисленные факторы, к которым можно отнести виды почвенных микроорганизмов, температуру, pH среды, а также наличие в составе материала химических добавок. Известно, что синтетический каучук можно комбинировать с термопластами. Полученные при этом термопластичные эластомеры будут обладать одновременно термопластичными

и эластомерными свойствами. Термопластичные свойства позволят их эффективнее перерабатывать.

Некоторые термопласты — полилактид (PLA) и поликапролактон (PCL) — имеют в своём составе гидролизуемые сложноэфирные связи, благодаря которым материалы на их основе демонстрируют хорошую гидролитическую деградацию [58]. Включение этих соединений в состав синтетического каучука может усилить биоразлагаемые свойства продукта. В настоящее время PLA, являясь полимером на биологической основе (производится из кукурузы или сахарной свеклы), широко используется при разработке экологически чистых пластиков, наполнителей для 3D-печати и в качестве компонента полимерных смесей. Термопластичный поли(эфир уретан), получаемый из PCL, гидрированного 4,4'-метиленидифенилдиизоцианата и цепеудлинителей различной длины (например, 2-этилмочевин диола, полученной из аминокислоты), полностью разлагается в течение 100 дней в щелочном растворе [59].

В качестве материалов для биоразлагаемых плёнок также могут применяться полиэфиры 1,4-бутандиола, 1,3-пропандиола и/или 2,3-бутандиола в комплексе с различными органическими кислотами, такими как молочная, себаценовая, итаконовая и янтарная [60].

G.Y. Yew и соавт. указали на возможность использования других биологических добавок, полученных из пищевых продуктов, растений (водорослей) [61]. Опубликованы работы по применению бионаполнителей в эластомеры из целлюлозы, крахмала, хитозана, PLA или полигликолевой кислоты [62].

В качестве бионаполнителя для латекса предложен крахмал. S. Daud и соавт. провели экспериментальные исследования с крахмалом саго для улучшения биоразлагаемости плёнок из натуральной резины [63]. Крахмал саго с сульфатно-эфирными группами был получен путём обработки водным раствором серной кислоты в течение 7 дней при комнатной температуре. Размер частиц крахмала при этом первоначально составлял 1,233 мкм, а после процесса кислотного гидролиза уменьшался до 0,313 мкм, что позволило получить латексные плёнки с равномерно инкорпорированными частицами крахмала. Биоразлагаемость таких плёнок составляла за 3 нед до 25%.

R. Blanchard и соавт. описали применение в качестве бионаполнителя для натуральной резины нанокристаллической целлюлозы [64]. Однако убедительных данных об антимикробной активности таких плёнок авторами представлено не было.

Заключение

Защитные перчатки являются важнейшим СИЗ, широко применяемым в различных сферах

деятельности, прежде всего в медицине. Выбор типа перчаток зависит от особенностей выполняемых работ и требований стандартов качества. Наиболее распространёнными материалами для изготовления перчаток являются нитрил, натуральный латекс и поливинилхлорид, соответствующие своим стандартам безопасности и эффективности. Современные международные стандарты, такие как ASTM и ISO, обеспечивают высокий уровень защиты от проникновения микроорганизмов, включая вирусы, бактерии и грибы. Однако исследования показывают, что даже при соблюдении всех мер предосторожности и использовании современных технологий существует риск проникновения микроорганизмов через повреждённые перчатки, особенно при выполнении сложных манипуляций, связанных с использованием острых инструментов.

Несмотря на значительные достижения в области производства защитных перчаток, остаётся необходимость дальнейшего совершенствования методов контроля качества и разработки новых подходов к обеспечению максимальной защиты работников. Это включает повышение осведомлённости персонала о правилах безопасного использования перчаток и внедрение инновационных решений для минимизации риска инфицирования.

Проблема утилизации отходов из синтетического каучука становится всё более актуальной ввиду сложности их разложения в естественных условиях. Несмотря на разнообразие синтетических каучуков, их длительное пребывание в окружающей среде создаёт серьёзные экологические проблемы. Современные исследования направлены на разработку материалов, обладающих улучшенными характеристиками биodeградации, таких как термопластичные эластомеры, содержащие гидролизуемые сложноэфирные связи, что позволит значительно ускорить процесс разложения. Использование биополимеров, таких как PLA и PCL, открывает перспективы для создания экологически чистых материалов, пригодных для широкого спектра приложений, включая производство одноразовых перчаток. Введение бионаполнителей, таких как крахмал и нанокристаллическая целлюлоза, будет способствовать улучшению биоразлагаемых свойств материалов, обеспечивая при этом сохранение необходимых физико-механических характеристик. Исследования в области модификации состава и структуры синтетических каучуков, направленные на увеличение скорости их биodeградации, необходимы для решения глобальной экологической проблемы, связанной с управлением отходами резиновых изделий. Использование комбинированных материалов, включающих как традиционные синтетические компоненты, так и биоразлагаемые добавки, представляется перспективным научным направлением развития индустрии полимерных материалов.

Анализ данных современной научной литературы продемонстрировал значительный рост интереса к разработке защитных перчаток с антимикробными свойствами. Несмотря на очевидную привлекательность идеи придания перчаткам антибактериальных качеств, её реализация сталкивается с рядом серьёзных технических и медицинских проблем. Важно учитывать не только эффективность противомикробных компонентов, но и их потенциальное воздействие на здоровье медицинского персонала, пациентов и окружающую среду. Необходимость разработки единых критериев оценки антимикробной активности и определения рисков требует комплексного рискориентированного подхода, учитывающего интересы всех заинтересованных сторон. Отсутствие унифицированных методик тестирования затрудняет сравнение результатов различных исследований и препятствует выработке общих рекомендаций по использованию антимикробных добавок.

Таким образом, для успешного продвижения идеи создания «антисептических» перчаток важно проводить дальнейшие научные исследования, направленные на создание надёжных и безопасных способов введения активных веществ, разрабатывать стандартные протоколы оценки антимикробной активности для последующего внедрения в практику здравоохранения.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Konnor R. 2021 national and state healthcare-associated infections progress report;2022. Available at: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/122407>
2. Акимкин В.Г., Брусина Е.Б., Брико Н.И., Тутельян А.В. Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи: состояние проблемы и перспективы. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2024;79(5):406–15. Akimkin V.G., Brusina E.B., Briko N.I., Tutelyan A.V. Healthcare-associated infections: state of the problem and prospects. *Annals Of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2024;79(5):406–15. DOI: <https://doi.org/10.15690/vramn17998> EDN: <https://elibrary.ru/gssqnk>
3. Брико Н.И., Фельдблюм И.В., Зуева Л.П. и др. Организация и проведение эпидемиологического наблюдения и микробиологического мониторинга в учреждения родовспоможения. Федеральные клинические рекомендации. М.;2015. Briko N.I., Feldblum I.V., Zueva L.P., et al. Organization and conduct of epidemiological surveillance and microbiological monitoring in obstetric institutions. Federal clinical guidelines. Moscow;2015.
4. Захарова Ю.А., Николаева А.М., Фельдблюм И.В. Ведущие факторы риска развития внутрибольничных гнойно-септических инфекций в акушерских стационарах. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2007;84(6):72–5. Zakharova Yu.A., Nikolaeva A.M., Feldblum I.V. Leading risk factors of development of nosocomial pyogenic and septic infections in maternity hospitals. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2007;84(6):72–5. EDN: <https://elibrary.ru/iisqez>
5. Брусина Е.Б., Зуева Л.П., Ковалишенина О.В. и др. Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи: современная доктрина профилактики. Часть 1. Исто-

- рические предпосылки. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2018;17(5):17–24. Brusina E.B., Zuyeva L.P., Kovalishena O.V., et al. Healthcare-associated infections: modern doctrine of prophylaxis. Part I. Historical background. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2018;17(5):17–24. DOI: <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-5-17-24> EDN: <https://elibrary.ru/yqxuyx>
6. Акимкин В.Г., Захарова Ю.А., Игонина Е.П., Болгарова Е.В. Нозокомиальные респираторные вирусные инфекции: современное состояние проблемы. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019;(5):50–61. Akimkin V.G., Zakharova Yu.A., Igonina E.P., Bolgarova E.V. Nosocomial respiratory viral infections: state of the problems. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2019;(5):50–61. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-5-50-61> EDN: <https://elibrary.ru/akeima>
 7. Алимов А.В., Игонина Е.П., Фельдблюм И.В. и др. Современное состояние проблемы энтеровирусных (неполио) инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. *Инфекция и иммунитет*. 2020;10(3):486–96. Alimov A.V., Igonina E.P., Feldblum I.V., et al. Current status of healthcare-associated enteroviral (non-polio) infections. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2020;10(3):486–96. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-CSF-1161> EDN: <https://elibrary.ru/gfnvrh>
 8. Акимкин В.Г., Алимов А.В., Захарова Ю.А. и др. Обзор актуальных вопросов диагностики и профилактики гемоконтактных нозокомиальных вирусных инфекций. *Вопросы вирусологии*. 2019;64(6):262–7. Akimkin V.G., Alimov A.V., Zakharova Yu.A., et al. Review of current issues of diagnosis and prevention of blood-borne nosocomial viral infections. *Problems of Virology*. 2019;64(6):262–7. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-262-267> EDN: <https://elibrary.ru/gglwtm>
 9. Preece D., Lewis R., Carré M.J. A critical review of the assessment of medical gloves. *Tribol. Mater. Surf. In.* 2021;15(1):10–9. DOI: <https://doi.org/10.1080/17515831.2020.1730619>
 10. Parisi C.A.S., Kelly K.J., Ansotegui I.J., et al. Update on latex allergy: New insights into an old problem. *World Allergy Organ. J.* 2021;14(8):100569. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.waojou.2021.100569>
 11. von Grote E.C., Palaniswamy K., Meckfessel M.H. Managing occupational irritant contact dermatitis using a two-step skincare regimen designed to prevent skin damage and support skin recovery. *J. Drugs Dermatol.* 2016;15(12):1504–10.
 12. Gunasegaran J., Teh Y.Y., Lim C.K., Ng S.F. Review on prevalence, risk factors, and research advancements on the use of medical gloves concerning hand dermatitis among health care workers. *Saf. Health Work.* 2024;15(2):129–38. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.shaw.2024.02.005>
 13. Горбачева Е.М., Ильюшина И.В., Шаматкова С.В. Перчатки в медицине (обзор литературы). *Смоленский медицинский альманах*. 2022;(1):80–3. Gorbachova E.M., Ilyushina I.V., Shamatkova S.V. Gloves in medicine. *Smolensk Medical Almanac*. 2022;(1):80–3. EDN: <https://elibrary.ru/uykfdb>
 14. Critchley E., Pemberton M.N. Latex and synthetic rubber glove usage in UK general dental practice: changing trends. *Heliyon*. 2020;6(5):e03889. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03889>
 15. Houston-Hicks M., Lura D.J., Highsmith M.J. Play hands protective gloves: technical note on design and concept. *Technol. Innov.* 2016;18(2-3):207–10. DOI: <https://doi.org/10.21300/18.2-3.2016.207>
 16. Юрченко С.А. Перчатки в системе профилактики гемоконтактных инфекций. *Медицинская сестра*. 2013;(8):31–4. Yurchenko S.A. Gloves in the system of prevention of blood contact infections. *Meditsinskaya sestra (The Nurse)*. 2013;(8):31–4. EDN: <https://elibrary.ru/rpcpnh>
 17. Болехан В.Н., Голота А.С., Крассий А.Б. и др. Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи: современное состояние проблемы. *Военно-медицинский журнал*. 2014;335(7):48–54. Bolekhan V.N., Golota A.S., Krassii A.B., et al. Healthcare-associated infections. the current state of the problem. *Military Medical Journal*. 2014;335(7):48–54. EDN: <https://elibrary.ru/sszhpl>
 18. Бояров А.А., Тихилов Р.М., Шубняков И.И., Мидаев А.И. Повреждение хирургических перчаток при эндопротезировании тазобедренного сустава. *Ортопедия, травматология и восстановительная хирургия детского возраста*. 2019;7(3):55–62. Boyarov A.A., Tikhilov R.M., Shubnyakov I.I., Midaev A.I. Glove damage in total hip arthroplasty. *Pediatric Traumatology, Orthopaedics and Reconstructive Surgery*. 2019;7(3):55–62. DOI: <https://doi.org/10.17816/PTORS7355-62> EDN: <https://elibrary.ru/ohuhrz>
 19. Лавренова Е.В. Хирургические перчатки. Всегда ли безопасно? *Медицинская сестра*. 2011;(6):32–4. Lavrenova E.V. Surgical gloves: are they always safe? *Meditsinskaya sestra (The Nurse)*. 2011;(6):32–4. EDN: <https://elibrary.ru/obuubn>
 20. Bardorf M.H., Jäger B., Boeckmans E., et al. Influence of material properties on gloves' bacterial barrier efficacy in the presence of microperforation. *Am. J. Infect. Control*. 2016;44(12):1645–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2016.03.070>
 21. Goldman A.H., Haug E., Owen J.R., et al. High risk of surgical glove perforation from surgical rotatory instruments. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2016;474(11):2513–17. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11999-016-4948-3>
 22. Wolfensberger A., Clack L., Kuster S.P., et al. Transfer of pathogens to and from patients, healthcare providers, and medical devices during care activity — a systematic review and meta-analysis. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2018;39(9):1093–107. DOI: <https://doi.org/10.1017/ice.2018.156>
 23. Разумова Д.В., Суборова Т.Н., Малышев В.В. Медицинские перчатки с внутренним антибактериальным покрытием — новации в области дезинфектологии. *Клиническая больница*. 2017;(1):24–7. Razumova D.V., Suborova T.N., Malichev V.V. Medical gloves with inner antibacterial coating — innovation of disinfectology. *The Hospital*. 2017;(1):24–7. EDN: <https://elibrary.ru/ynlnkwj>
 24. Монов Д. Изучение поведения медицинского персонала при проведении гемотрансфузионных вмешательств в медицинских учреждениях. *Евразийский союз ученых. Серия: медицинские, биологические и химические науки*. 2021;(5):37–43. Monov D. Study of the behavior of medical personnel during hemotransfusion interventions in medical institutions. *Eurasian Union of Scientists. Series: Medical, Biological and Chemical Sciences*. 2021;(5):37–43. EDN: <https://elibrary.ru/tklkfj>
 25. Сергеев В.И., Шарипова И.С., Маркович Н.И. и др. Оценка возможности проникновения возбудителей гнойно-септических инфекций через латексные медицинские перчатки. *Дезинфекционное дело*. 2010;(2):25–7. Sergeev V.I., Sharipova I.S., Markovitch N.I., et al. Value feasibility of entry agents of pyo-septic infection through medical latex gloves. *Disinfection Affairs*. 2010;(2):25–7. EDN: <https://elibrary.ru/mtbkuh>
 26. Tenorio A.R., Badri S.M., Sahgal N.B., et al. Effectiveness of gloves in the prevention of hand carriage of vancomycin-resistant enterococcus species by health care workers after patient care. *Clin. Infect. Dis.* 2001;32(5):826–9. DOI: <https://doi.org/10.1086/319214>
 27. Моторин Д.Е. К вопросу о развитии механизма регуляции медицинских отходов. *Правовая парадигма*. 2021;20(3):193–9. Motorin D.E. On the development of the

- mechanism for regulating medical waste. *Legal Concept*. 2021; 20(3):193–9. DOI: <https://doi.org/10.15688/lc.jvol2021.3.28> EDN: <https://elibrary.ru/qcoqmb>
28. Киек О.В., Полуланова Н.В., Черняева Н.О. и др. Обращение с медицинскими отходами в условиях современного здравоохранения – проблемы и пути решения. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2022;29(3):121–34. Kiek O.V., Polupanova N.V., Chernyaeva N.O., et al. Medical waste management in today's healthcare: issues and progress. *Kuban Scientific Medical Bulletin*. 2022;29(3):121–34. DOI: <https://doi.org/10.25207/1608-6228-2022-29-3-121-134> EDN: <https://elibrary.ru/ttjzhi>
29. Хайруллаева Н.З., Токанова Ш.Е., Омарбеков Е.Д. и др. Вопросы организации безопасного обращения с отходами лечебно-профилактических учреждений. Обзор литературы. *Наука и здравоохранение*. 2023;25(6):246–59. Khayrullayeva N.Z., Tokanova Sh.E., Omarbekov E.D., et al. Issues of organizing safe management of waste from healthcare institutions. Review. *Science & Healthcare*. 2023;25(6):246–59. DOI: <https://doi.org/10.34689/SH.2023.25.6.027> EDN: <https://elibrary.ru/bvhpzc>
30. Vetoshkina E.D., Koshcheeva E.S., Smirnov M.A. Problems of legal regulation of medical waste disposal. *Theoretical and Applied Ecology*. 2021;(4):224–9. DOI: <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2021-4-224-229> EDN: <https://elibrary.ru/rfqqa>
31. Минигазимов Н.С., Азнагулов Д.Р., Минигазимова Л.И. Токсичные отходы, образующиеся у населения. Проблемы сбора, обезвреживания и утилизации. *Медицина труда и экология человека*. 2023;(2):117–28. Minigazimov N.S., Aznagulov D.R., Minigazimova L.I. Toxicological waste generated by the population. problems and solutions. *Occupational Medicine and Human Ecology*. 2023;(2):117–28. DOI: <https://doi.org/10.24412/2411-3794-2023-10208> EDN: <https://elibrary.ru/lplfms>
32. Зинченко А.А. Разработка стратегии обращения с медицинскими отходами в Российской Федерации. *Отходы и ресурсы*. 2022;9(2):14. Zinchenko A.A. Development of a strategy for managing medical waste management in the Russian Federation. *Russian Journal of Resources, Conservation and Recycling*. 2022;9(2):14. DOI: <https://doi.org/10.15862/16NZOR222> EDN: <https://elibrary.ru/byklmg>
33. Круско О.В., Козлова С.А. Современное состояние проблемы загрязнения окружающей среды средствами индивидуальной защиты медицинского назначения. *Сборник научных трудов Ангарского государственного технического университета*. 2024;(21):367–76. Krusko O.V., Kozlova S.A. The current state of the problem of environmental pollution with personal protective equipment for medical purposes. *Collection of Scientific Papers of Angarsk State Technical University*. 2024;(21):367–76. EDN: <https://elibrary.ru/jgpxku>
34. Хамитова Г.М., Хабиров А.И. Правовое регулирование утилизации медицинских отходов в зарубежном праве. *Право и управление. XXI век*. 2021;17(2):53–60. Khamitova G.M., Khabirov A.I. Legal regulation of medical waste disposal in foreign law. *Journal of Law and Administration*. 2021;17(2):53–60. DOI: <https://doi.org/10.24833/2073-8420-2021-2-59-53-60> EDN: <https://elibrary.ru/tfstxh>
35. Lovato M.J., Del Valle L.J., Puiggali J., Franco L. Performance-enhancing materials in medical gloves. *J. Funct. Biomater*. 2023;14(7):349. DOI: <https://doi.org/10.3390/jfb14070349>
36. Knobloch J.K., Tofern S., Kunz W., et al. "Life-like" assessment of antimicrobial surfaces by a new touch transfer assay displays strong superiority of a copper alloy compared to silver containing surfaces. *PLoS One*. 2017;12(11):e0187442. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187442>
37. Paosen S., Lethongkam S., Wunnoo S., et al. Prevention of nosocomial transmission and biofilm formation on novel biocompatible antimicrobial gloves impregnated with biosynthesized silver nanoparticles synthesized using Eucalyptus citriodora leaf extract. *Biotechnol. J*. 2021;16(9):e2100030. DOI: <https://doi.org/10.1002/biot.202100030>
38. Huang C., Li J., Mou W., Liu Y. Extremely well-dispersed zinc oxide nanofluids with excellent antibacterial, antifungal, and formaldehyde and toluene removal properties. *Ind. Eng. Chem. Res*. 2022;61(11):3973–82. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.2c00369>
39. Chen X., Qiu T., Christoforo T., et al. Durable and nontoxic natural rubber-based composites with antibacterial properties. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2022;14(49):55155–66. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsami.2c20867>
40. Smiechowiec E., Klonowska M., Niekraszewicz B., Strzelinska M., et al. Knitted structures made of antibacterial fibers intended for protective gloves. *Materials (Basel)*. 2023;16(23):7276. DOI: <https://doi.org/10.3390/ma16237276>
41. Arpornwichanop T., Polpanich D., Thiramanas R., et al. Enhanced antibacterial activity of NR latex gloves with raspberry-like PMMA-N,N,N-trimethyl chitosan particles. *Int. J. Biol. Macromol*. 2015;81:151–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.07.063>
42. Thakur A.K., Sathyamurthy R., Ramalingam V., et al. A case study of SARS-CoV-2 transmission behavior in a severely air-polluted city (Delhi, India) and the potential usage of graphene based materials for filtering air-pollutants and controlling/monitoring the COVID-19 pandemic. *Environ. Sci. Process Impacts*. 2021;23(7):923–46. DOI: <https://doi.org/10.1039/d1em00034a>
43. Li T., Su Y., Wang D., et al. High antibacterial and barrier properties of natural rubber comprising of silver-loaded graphene oxide. *Int. J. Biol. Macromol*. 2022;195:449–55. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.029>
44. Alshabanah L.A., Hagar M., Al-Mutabagani L.A., et al. Hybrid nanofibrous membranes as a promising functional layer for personal protection equipment: manufacturing and antiviral/antibacterial assessments. *Polymers (Basel)*. 2021;13(11):1776. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym13111776>
45. Kahar Bador M., Rai V., Yusof M.Y., et al. Evaluation of the efficacy of antibacterial medical gloves in the ICU setting. *J. Hosp. Infect*. 2015;90(3):248–52. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2015.03.009>
46. Ali S., Wilson A.P.R. Effect of poly-hexamethylene biguanide hydrochloride (PHMB) treated non-sterile medical gloves upon the transmission of *Streptococcus pyogenes*, carbapenem-resistant *E. coli*, MRSA and *Klebsiella pneumoniae* from contact surfaces. *BMC Infect. Dis*. 2017;17(1):574. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2661-9>
47. Suchomel M., Brillmann M., Assadian O., et al. Chlorhexidine-coated surgical gloves influence the bacterial flora of hands over a period of 3 hours. *Antimicrob. Resist. Infect. Control*. 2018;7:108. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0395-0>
48. Leitgeb J., Schuster R., Yee B.N., et al. Antibacterial activity of a sterile antimicrobial polyisoprene surgical glove against transient flora following a 2-hours simulated use. *BMC Surg*. 2015;15:81. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12893-015-0058-5>
49. Arakkal A., Rathinam P., Paramban S., Gopinathan H. Antibacterial natural rubber latex films with surface-anchored quaternary poly(4-vinylpyridine) polyelectrolyte. *React. Funct. Polym*. 2022;172:105190. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2022.105190>
50. Moopayak W., Tangboriboon N. Mangosteen peel and seed as antimicrobial and drug delivery in rubber products. *J. Appl. Polym. Sci*. 2020;137(37):49119. DOI: <https://doi.org/10.1002/app.49119>
51. Luengchavanon M., Ananchaenwong E., Marthosa S., et al. Application of antimicrobial rubber-coated cotton gloves for mangosteen-peel-extract-mediated biosynthesis of Ag-ZnO nanocomposites. *Polymers (Basel)*. 2024;17(1):32. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym17010032>

52. Khanzada H., Salam A., Qadir M.B., et al. Fabrication of promising antimicrobial aloe vera/PVA electrospun nanofibers for protective clothing. *Materials (Basel)*. 2020;13(17):3884. DOI: <https://doi.org/10.3390/ma13173884>
53. Salvadores Fernandez C., Jaufuraully S., Bagchi B., et al. A triboelectric nanocomposite for sterile sensing, energy harvesting, and haptic diagnostics in interventional procedures from surgical gloves. *Adv. Healthc. Mater.* 2023;12(17):e2202673. DOI: <https://doi.org/10.1002/adhm.202202673>
54. Bayan S., Adhikari A., Pal U., et al. Development of triboelectrochemical fabrics for potential applications in self-sanitizing personal protective equipment. *ACS Appl. Bio Mater.* 2021;4(7):5485–93. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsabm.1c00314>
55. Klupp E.M., Knobling B., Franke G., et al. Activity of antimicrobial examination gloves under realistic conditions: challenge not fulfilled. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* 2023;12(1):116. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13756-023-01322-z>
56. Patil D., Golia V., Overland M., et al. Mechanobactericidal nanotopography on nitrile surfaces toward antimicrobial protective gear. *ACS Macro Lett.* 2023;12(2):227–33. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsmacrolett.2c00697>
57. Ab Rahman M.F., Rusli A., Misman M.A., Rashid A.A. Biodegradable gloves for waste management post-COVID-19 outbreak: a shelf-life prediction. *ACS Omega*. 2020;5(46):30329–35. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c04964>
58. Wissamitanan T., Dechwayukul C., Kalkornsurapranee E., Thongruang W. Proper blends of biodegradable polycaprolactone and natural rubber for 3D printing. *Polymers (Basel)*. 2020;12(10):2416. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym12102416>
59. Brannigan R.P., Walder A., Dove A.P. Application of modified amino acid-derived diols as chain extenders in the synthesis of novel thermoplastic polyester-urethane elastomers. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2017;5(8):6902–9. DOI: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b01110>
60. Hu X., Shen X., Huang M., Liu C. Biodegradable unsaturated polyesters containing 2,3-butanediol for engineering applications: synthesis, characterization and performances. *Polymer*. 2016;84:343–54. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2016.01.007>
61. Yew G.Y., Tham T.C., Show P.L., et al. Unlocking the secret of bio-additive components in rubber compounding in processing quality nitrile glove. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2020;191(1):1–28. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03207-7>
62. Razak N.S., Mohamed R. Antimicrobial sustainable biopolymers for biomedical plastics applications – an overview. *Polimery*. 2021;66(11-12):574–83. DOI: <https://doi.org/10.14314/polimery.2021.11.2>
63. Daud S., You Y.S., Azura A.R. The effect of acid hydrolyzed sago starch on mechanical properties of natural rubber and carboxylated nitrile butadiene rubber latex. *Mater. Today Proc.* 2019;17:1047–55. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.06.511>
64. Blanchard R., Ogunsona E., Hojabr S., Berry R. Synergistic cross-linking and reinforcing enhancement of rubber latex with cellulose nanocrystals for glove applications. *ACS Appl. Polym. Mater.* 2020;2(2):887–98. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsapm.9b01117>

Информация об авторах

Захарова Юлия Александровна — д-р мед. наук, профессор, научный руководитель Института дезинфектологии ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана, Москва, Россия, zakharova.ya@fncg.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3416-0902>

Новиков Вячеслав Алексеевич — м. н. с. отдела дезинфекции и стерилизации (с лабораторией микробиологии) Института дезинфектологии ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана, Москва, Россия, novikov.va@fncg.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8858-5872>

Андреев Сергей Викторович — канд. хим. наук, зам. директора Института дезинфектологии ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана, Москва, Россия, svandreev.niid@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2405-9931>

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>

Участие авторов: Захарова Ю.А. — идея публикации, написание текста, редактирование основного текста, заключительное оформление; Новиков В.А., Андреев С.В. — поиск источников литературы, написание основного текста; Макарова М.А. — итоговая редакция, оформление заключения. 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 28.07.2025;
принята к публикации 07.10.2025;
опубликована 31.10.2025

Information about the authors

Yulia A. Zakharova — Dr. Sci. (Med.), Professor, Scientific director, Institute of Disinfection, F.F. Erisman Federal Scientific Center of Hygiene, Moscow, Russia, zakharova.ya@fncg.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3416-0902>

Vyacheslav A. Novikov — junior researcher, Department of disinfection and sterilization (with microbiology laboratory), Institute of Disinfection, F.F. Erisman Federal Scientific Center of Hygiene, Moscow, Russia, novikov.va@fncg.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8858-5872>

Sergey V. Andreev — Cand. Sci. (Chem.), Deputy Director, Institute of Disinfection, F.F. Erisman Federal Scientific Center of Hygiene, Moscow, Russia, svandreev.niid@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2405-9931>

Mariia A. Makarova — Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, senior researcher, Head, Laboratory of enteric infection, Saint-Peterburg Pasteur Institute; Professor, Department of Medical Microbiology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia, makmaria@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3600-2377>

Authors' contribution: Zakharova Yu.A. — idea of the publication, writing the text, editing the main text, final design; Novikov V.A., Andreev S.V. — search for literary sources, writing the main text; Makarova M.A. — final editing, design of the conclusion. 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 28.07.2025;
accepted for publication 07.10.2025;
published 31.10.2025

ЮБИЛЕИ

**К 70-летию академика РАН Александра Николаевича Куличенко**

23 сентября 2025 года отметил 70-летие Александр Николаевич Куличенко, доктор медицинских наук, профессор, академик Российской академии наук, директор Ставропольского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора.

Александр Николаевич Куличенко — известный российский учёный, микробиолог, академик РАН, более 45 лет своей жизни посвятил проблемам борьбы с особо опасными инфекциями. За годы научной и научно-организационной деятельности А.Н. Куличенко внёс неоценимый вклад в развитие молекулярной диагностики особо опасных инфекций в нашей стране.

Александр Николаевич в 1978 г. с отличием окончил Саратовский медицинский институт. В течение 29 лет работал в Российском научно-исследовательском противочумном институте «Микроб» (Саратов), где прошёл путь от аспиранта до заместителя директора по научной работе. Здесь он сформировался как учёный и в составе авторского коллектива был удостоен Государственной премии Российской Федерации в области науки и техники (2003 г.) за заслуги в области разработки новых методов диагностики и профилактики сибирской язвы.

Научная деятельность академика А.Н. Куличенко охватывает широкий круг задач современной молекулярной биологии и эпидемиологии. На основании анализа структуры геномов возбудителей чумы, сибирской язвы, бруцеллёза им были разра-

ботаны и внедрены в практику первые ПЦР-тест-системы для детекции этих особо опасных патогенов, научно обоснованы принципы пробоподготовки при ПЦР-анализе, нашедшие отражение в действующей методической базе по генной диагностике инфекционных болезней. В работах Александра Николаевича развито современное научное направление — алгоритмы применения методов молекулярного анализа в эпидемиологии природно-очаговых и других зоонозных инфекций, разработаны приёмы последовательного генотипирования при эпидемиологическом надзоре, предложен комплексный подход к мониторингу зоонозных инфекций на основе анализа генома патогенов и технологий с использованием геоинформационных систем в реальном времени. А.Н. Куличенко впервые проведены исследования по генетическому профилированию современных вариантов возбудителей природно-очаговых и особо опасных инфекций в регионах Южного и Северо-Кавказского федеральных округов, вскрыты особенности процессов микроэволюции возбудителей чумы, Крымской геморрагической лихорадки, сибирской язвы, территориальной приуроченности штаммов. Под его руководством получены приоритетные данные по филогенетике возбудителей бруцеллёза и сибирской язвы. Предложены и внедрены в практику новые современные подходы к прогнозируемому моделированию природно-очаговых инфекционных болезней с применением информационных технологий, дистанционного зондирования Земли из космоса и с помощью беспилотных летательных аппаратов.

В июле 2007 г. Александр Николаевич Куличенко принял руководство Ставропольским научно-исследовательским противочумным институтом Роспотребнадзора, и сегодня его имя неразрывно связано с новейшей историей института. За это время Ставропольский противочумный институт стал развивающимся научно-практическим комплексом, решающим задачи в области эпидемиологического надзора, диагностики и профилактики особо опасных инфекций. Благодаря организаторскому таланту и большому труду А.Н. Куличенко, был введён в эксплуатацию (2013 г.) новый основной лабораторный корпус института, отвечающий современным достижениям науки и оснащённый передовым оборудованием. В 2023 г. продлены на очередной срок полномочия сотрудничающего с Всемирной орга-

низацией здравоохранения (ВОЗ) Научно-исследовательского центра по чуме, функционирующего на базе Ставропольского научно-исследовательского противочумного института. С именем А.Н. Куличенко связано развитие инновационных направлений в институте: постгеномных технологий, метагеномного анализа, применение молекулярного анализа в эпидемиологии.

Важной вехой в жизни института в этот период было участие в военной операции в Южной Осетии в 2008 г. Александр Николаевич лично возглавил специализированную противэпидемическую бригаду института, которая приступила к работе уже на третий день военных действий. Итогами работы бригады были обеспечение эпидемического благополучия населения и воинских контингентов, восстановление централизованного водоснабжения г. Цхинвала, восстановление деятельности санитарно-эпидемиологической службы Республики Южная Осетия.

Другие важные достижения института под руководством Александра Николаевича — обеспечение эпидемиологического благополучия во время зимней Олимпиады в Сочи 2014 г. и текущей и референсной лабораторной диагностики во время пандемии COVID-19, за которую 44 сотрудника института были награждены орденами Пирогова и медалями Луки Крымского.

Сегодня институт стал мощным многопрофильным центром. Активно функционируют 3 референс-центра и сотрудничающий с ВОЗ центр по чуме, Проблемная комиссия Учёного совета Роспотребнадзора «Профилактика болезней, общих для человека и животных».

А.Н. Куличенко ведёт активную общественную и научную деятельность. Он является членом Президиума Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, заместителем председателя Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации, членом редакционного совета журналов «Проблемы особо опасных инфекций» и «Бактериология», членом редакционной коллегии изданий: «Журнал

микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии», «Медицинский вестник Северного Кавказа».

Большое влияние на становление Александра Николаевича как учёного оказало творческое руководство академика РАН Г.Г. Онищенко, существенное значение в формировании его научного потенциала имели постоянные деловые контакты с учёными-академиками А.Л. Гинцбург, В.В. Кутыревым, И.А. Дятловым и др.

А.Н. Куличенко — автор (соавтор) 35 монографий, более 700 опубликованных научных работ, 62 патентов Российской Федерации на изобретение. Под руководством А.Н. Куличенко сформирована научная школа по молекулярному анализу возбудителей особо опасных инфекций. При его научном руководстве и консультировании защищены 3 диссертации на соискание учёной степени доктора наук и 22 — на соискание учёной степени кандидата наук.

А.Н. Куличенко — лауреат Государственной премии Российской Федерации в области науки и техники (2003 г.), имеет государственные награды: «Орден Пирогова» (2021 г.), медали ордена «За заслуги перед Отечеством» I и II степени (2018 и 2009 гг.), награждён грамотами Президента Российской Федерации, удостоен нагрудного знака «Почётный работник Роспотребнадзора», а также «Орденом Дружбы» Республики Южная Осетия (2020).

Научная деятельность академика РАН, доктора медицинских наук, профессора Александра Николаевича Куличенко вносит значительный вклад в развитие отечественной науки.

Многотысячный коллектив членов Общероссийской общественной организации «Всероссийское научно-практическое общество эпидемиологов, микробиологов и паразитологов», редакция «Журнала микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии» поздравляют Александра Николаевича Куличенко с 70-летним юбилеем. Примите искренние пожелания успехов в Вашем важном деле! Пусть этот знаменательный рубеж станет предпосылкой для новой, яркой страницы Вашей жизни. От всей души желаем Вам здоровья, творческих сил и вдохновения для новых побед и великих свершений!

ХРОНИКА



РЕЗОЛЮЦИЯ

**Конгресса с международным участием «Эпидемиология — 2025»
(Москва, 15–16 октября 2025 г.)**

15–16 октября 2025 г. в соответствии с Приказом Руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 21.05.2025 № 388 состоялся Конгресс с международным участием «Эпидемиология — 2025». Конгресс был организован Центральным научно-исследовательским институтом эпидемиологии Роспотребнадзора при поддержке Российской академии наук, Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, Национальной ассоциации специалистов по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского, Федерации лабораторной медицины и Ассоциации медицинских микробиологов.

В заседаниях Конгресса приняли участие более 800 человек очно (в том числе более 20 членов РАН) и около 3000 онлайн из 78 субъектов Российской Федерации и 17 зарубежных стран (Абхазия, Азербайджан, Армения, Белоруссия, Ботсвана, Бурунди, Гвинейская Республика, Вьетнам, Казахстан, Киргизия, Нигерия, Никарагуа, Таджикистан, Уганда, Узбекистан, Швейцария, Южная Осетия). В работе Конгресса приняли участие специалисты Роспотребнадзора, Минздрава России, Минобрнауки России, ФМБА России, Росздравнадзора, Минобороны России, других ведомств и медицинских организаций, сотрудники научно-исследовательских институтов, студенты и преподаватели высших учебных заведений, члены профессиональных научных сообществ.

Реализация приоритетных задач в сфере обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения и биобезопасности Российской Федерации регламентируется рядом государственных документов: Федеральным законом от 30.12.2020 № 492-ФЗ «О биологической безопасности в Российской Федерации», Указом Президента Российской Федерации от 07.05.2024 № 309 «О национальных целях развития Российской Федерации на период до 2030 года и на перспективу до 2036 года», в соответствии с которыми целью государственной политики является поддержание допустимого уровня риска негативного воздействия опасных факторов на население и окружающую среду.

Кроме того, в Российской Федерации реализуются и направлены на обеспечение биологической безопасности следующие федеральные проекты и государственные программы:

- Федеральный проект «Санитарный щит страны — безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)» на 2022–2030 гг.;
- Федеральная научно-техническая программа развития генетических технологий на 2019–2030 гг.;
- Государственная программа Российской Федерации «Обеспечение химической и биологической безопасности Российской Федерации» на 2021–2027 гг. и др.

Научная повестка Конгресса открылась масштабным пленарным заседанием, которое началось с приветствия Руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека А.Ю. Поповой.

В приветственном слове А.Ю. Поповой было отмечено, что эпидемиология инфекционных болезней в России является одной из быстро развивающихся областей медицинской науки и практики. Глобализация современного общества, изменение климата, миграция населения способствуют формированию благоприятных условий для распространения многих инфекционных болезней, что требует совершенствования системы управления эпидемическим процессом на основе разработки и внедрения новых технологий эпидемиологического надзора и контроля, и предложенная организаторами научная программа Конгресса всесторонне охватывает проблему эпидемиологии с позиции приоритетных междисциплинарных исследований.

Приветствия в адрес участников Конгресса поступили также из Совета Федерации Федерального собрания Российской Федерации, Государственной Думы Российской Федерации, Российской академии наук, Отделения медицинских наук Российской академии наук.

Работа Конгресса началась научным докладом директора ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора академика РАН В.Г. Акимкина. В докладе была подчеркнута историческая зна-

чимось вкладом отечественных учёных в развитие теоретических основ эпидемиологии как общемедицинской науки. Автором были отмечены современные эпидемиологические угрозы для мирового здравоохранения и тренды в области эпидемиологии, актуальные направления эпидемиологического надзора за возбудителями инфекционных болезней, включая геномный эпидемиологический надзор. В.Г. Акимкиным были рассмотрены пути совершенствования эпидемиологического надзора с применением цифровых технологий, современных методов диагностики и профилактики инфекционных болезней на основе инновационных биоинженерных и генетических технологий. Отмечено, что геномный эпидемиологический надзор за возбудителями болезней, обладающими пандемическим и высоким эпидемическим потенциалом, направлен на мобилизацию усилий по быстрому выявлению и изучению свойств патогенов с целью своевременной оценки эпидемиологической обстановки и организации эффективных профилактических и противозидемических мероприятий.

Особый интерес вызвали доклады известных отечественных учёных: профессора Р.Г. Василовой, академиков РАН О.А. Свитич, В.В. Кутырева, И.А. Дятлова, А.А. Тотоляна, В.М. Говоруна, Н.И. Брико и профессора И.В. Ямпольского. В рамках Конгресса проведены пленарное и 23 секционных заседаний, заслушано 165 научных докладов. Проведено совместное заседание научных обществ (Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, Национальной ассоциации специалистов по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского, Федерации лабораторной медицины, Ассоциации медицинских микробиологов), комиссии Научного совета по микробиологии, эпидемиологии и инфекционным болезням Отделения медицинских наук РАН, комиссии Научного совета по генетике и селекции Отделения биологических наук РАН, Проблемной комиссии Учёного Совета Роспотребнадзора по Федеральному проекту «Санитарный щит страны — безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)», Проблемной комиссии Учёного Совета Роспотребнадзора по профилактике инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, посвящённое актуальным аспектам фундаментальных и прикладных исследований в области эпидемиологии и совершенствования эпидемиологического надзора с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации.

Ключевой темой Конгресса являлись вопросы совершенствования эпидемиологического надзора, профилактики заноса и распространения на территорию Российской Федерации возбудителей инфекционных болезней и реализации экстерриториаль-

ного мониторинга за возбудителями инфекционных болезней, совершенствования системы управления эпидемическим процессом и обеспечения биологической безопасности Российской Федерации. В прозвучавших докладах была подчёркнута важность контроля рисков, связанных с появлением новых инфекций, вызываемых неизвестными патогенами, преодолением микроорганизмами и вирусами межвидовых барьеров в сочетании с возникающими под воздействием внешней среды изменениями генотипа и фенотипа макроорганизмов человека и животных, распространением антимикробной резистентности и др.

Отдельные секционные заседания были посвящены вопросам эпидемиологии, диагностики и профилактики различных нозологических форм инфекций (ВИЧ-инфекция, природно-очаговые инфекции, вирусные гепатиты, туберкулёз, острые респираторные вирусные инфекции, инфекции желудочно-кишечного тракта и др.), антибиотикорезистентности, современным достижениям в области биотехнологических разработок и цифровизации для решения значимых эпидемиологических задач.

Участники Конгресса отметили высокий научный уровень представленных сообщений и глубокий профессиональный интерес участников к различным направлениям современной эпидемиологии. В рамках заседаний секций участниками была развёрнута активная творческая дискуссия по рассматриваемым научным и практическим вопросам.

Таким образом, участниками Конгресса была отмечена важность эпидемиологии как общемедицинской науки, актуальность современных направлений совершенствования эпидемиологического надзора, включая геномный эпидемиологический надзор за возбудителями инфекционных болезней, цифровизацию, активное использование достижений в области биоинженерии и инновационных генетических технологий с целью решения актуальных вопросов обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и биобезопасности Российской Федерации.

Учитывая исключительную важность развития эпидемиологической науки и практики в современных условиях, принимая во внимание результаты научных дискуссий и представленных докладов на Конгрессе, участники Конгресса постановили:

Признать деятельность Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека и других министерств и ведомств по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения и биологической безопасности в Российской Федерации важнейшим направлением государственной политики.

Отметить исключительную важность консолидации усилий научного сообщества в области обе-

ХРОНИКА

спечения биологической безопасности государства и предотвращения угроз пандемического распространения возбудителей инфекционных болезней.

Развивать междисциплинарное взаимодействие учёных в области эпидемиологии, биотехнологии, генетики и инфекционных болезней для обеспечения национальной безопасности и технологической независимости Российской Федерации.

Признать приоритетным научным направлением развитие геномного эпидемиологического надзора как современного уникального инструмента управления эпидемическим процессом.

Рекомендовать активное применение цифровых технологий и результатов анализа больших данных в практику эпидемиологического надзора.

Развивать подходы по совершенствованию лабораторной диагностики возбудителей инфекционных болезней с разработкой тест-систем для инди-

кации и идентификации возбудителей на основе молекулярно-биологических методов исследования.

Расширить инновационные технологии редактирования генома с целью разработки новых диагностических, лечебных и вакцинных препаратов.

Развивать направления профессиональной образовательной деятельности по актуальным направлениям научных исследований в области эпидемиологии, в том числе по соблюдению требований биологической безопасности, предупреждению формирования и распространения устойчивости микроорганизмов к противомикробным препаратам, продолжить практики проведения интерактивных семинаров и дистанционного обучения.

Признать работу Конгресса успешной и результативной, способствующей развитию эпидемиологической науки и укреплению системы биологической безопасности государства.

Директор ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора, академик РАН,
доктор медицинских наук, профессор
В.Г. Акимкин