

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 в области эпидемиологии, микробиологии, вирусологии, иммунобиологии, в том числе иммунодиагностики и иммунопрофилактики. 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 оригинальные статьи российских и зарубежных исследователей, обзоры, лекции, краткие сообщения, рецензии, а также методические материалы, законодательные документы в области сохранения инфекционной безопасности населения..

Журнал входит в 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:

03.02.02 Вирусология (медицинские и биологические науки);
03.02.03 Микробиология (медицинские и биологические науки);
14.02.02 Эпидемиология (медицинские и биологические науки);
14.03.09 Клиническая иммунология, аллергология (медицинские и биологические науки)

2

МАРТ – АПРЕЛЬ

**ТОМ 97
2020**

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: 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.

Статьи иностранных авторов,
а также отдельно рекомендован-
ные Редакционной коллегией,
публикуются на русском
и английском языках
под единым DOI.

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

Russian Science Citation Index
(RSCI), интегрированная
с платформой Web of Science,
EBSCO Publishing
(на платформе EBSCOhost).

ПОДПИСКА:

по каталогу «Газеты и Журналы»:

71420

по каталогу «Пресса по подписке»:
E71436

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

<https://www.microbiol.elpub.ru;>

<https://www.elibrary.ru;>

<https://www.cyberleninka.ru;>

<https://www.rucont.ru;>

<https://www.ebsco.com>.

ИЗДАТЕЛЬ:

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

197101, Москва,

ул. Новогиреевская, д. 3А.

Тел.: +7(495) 974-96-46.

E-mail: crie@pcr.ru

РЕДАКЦИЯ:

105064 г. Москва,

Малый Казенный пер., д. 5А.

Тел.: +7(925)011-87-79.

E-mail: jmei@crie.ru.

*Начальник редакционно-
издательского отдела:*
Осокина Ольга Владимировна

Заведующая редакцией:

Устинкова Ольга Владимировна.

Редакция не несет ответственности
за содержание рекламных
материалов.

К публикации принимаются только
статьи, подготовленные в соответ-
ствии с правилами для авторов
(см. www.microbiol.elpub.ru).

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

Подписано в печать 31.03.2020.

Формат 60×90^{1/8}.

Тираж 250 экз. Усл.-печ. л. 6,5.

Отпечатано в типографии

«Буки Веди». www.bukivedi.com.

E-mail: info@bukivedi.com.

© ФБУН ЦНИИ эпидемиологии
Роспотребнадзора, 2020

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор

Зверев В.В., докт. биол. наук, проф., акад. РАН, ФБГНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Заместитель главного редактора

Семенов Т.А., докт. мед. наук, проф., ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи», ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Ответственный секретарь

Платонов А.Е., докт. биол. наук, проф., ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Редакционная коллегия

Акимкин В.Г., докт. мед. наук, проф., акад. РАН, ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Брико Н.И., докт. мед. наук, проф., акад. РАН, Институт общественного здоровья им. Ф.Ф. Эрисмана ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Брусина Е.Б., докт. мед. наук, проф., ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет», Кемерово, Россия

Бухарин О.В., докт. мед. наук, проф., акад. РАН, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», Оренбург, Россия

Гинцбург А.Л., докт. мед. наук, проф., акад. РАН, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Жирнов О.П., докт. биол. наук, проф., член-корр. РАН, Институт вирусологии им. Д.И. Иванова ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи», Москва, Россия

Караулов А.В., докт. мед. наук, проф., акад. РАН, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Кутырев В.В., докт. мед. наук, проф., акад. РАН, ФКУЗ «Российский научно-исследовательский институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия

Лобзин Ю.В., докт. мед. наук, проф., акад. РАН, ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

Лукашев А.Н., докт. мед. наук, проф., член-корр. РАН, Институт медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Максютов Р.А., докт. биол. наук, ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии (Вектор)» Роспотребнадзора, Новосибирск, Россия

Малеев В.В., докт. мед. наук, проф., акад. РАН, ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Михайлов М.И., докт. мед. наук, проф., член-корр. РАН, ФБГНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Институт молекулярной и персонализированной медицины ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования», Москва, Россия; ФГАОУ «Белгородский государственный университет», Белгород, Россия

Онищенко Г.Г., докт. мед. наук, проф., акад. РАН, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Покровский В.И., докт. мед. наук, проф., акад. РАН, ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Свитич О.А., докт. мед. наук, член-корр. РАН, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Сергиев В.П., докт. мед. наук, проф., акад. РАН, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Тартаковский И.С., докт. биол. наук, проф., ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи», Москва, Россия

Тотоян А.А., докт. мед. наук, проф., акад. РАН, ФБУН «Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Урываев Л.В., докт. мед. наук, проф., член-корр. РАН, Институт вирусологии им. Д.И. Иванова ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи», Москва, Россия

Филатов Н.Н., докт. мед. наук, проф., член-корр. РАН, ФБГНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Черкасов С.В., докт. мед. наук, проф., член-корр. РАН, ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», Оренбург, Россия

Шаркова В.А., докт. мед. наук, проф., ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет», Владивосток, Россия

Иностранные члены редакционной коллегии

Shubhada Voregamage, 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, Vice-president of the European Academy of Natural Sciences, President of the R. Koch Medical Society (Germany), Chairman of German-Russian Koch-Mechnikov Forum, Berlin, Germany

Werner Lubitz, MSc, PhD, Professor, VP R&D, Founder, Biotech Innovation Research Development & Consulting, Vienna, Austria

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

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

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

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 dedicate to the most significant issues of world science and provides a synthesis of the cutting edge research in the field of medical microbiology, virology, infectious epidemiology, immunology, vaccinology, prevention and medication of human infectious diseases.

The journal accepts for publication Russian and foreign original articles, reviews, lectures, methodological materials and legislative documents in the field of preserving the infectious safety of the population.

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 research of infectology and a comprehensive approach to creating innovative technologies.

The journal is 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:

- 03.02.02 Virology (medical and biological sciences);
- 03.02.03 Microbiology (medical and biological sciences);
- 14.02.02 Epidemiology (medical and biological sciences);
- 14.03.09 Clinical immunology, Allergology (medical and sciences)

2

MARCH – APRIL

VOLUME 97

2020

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: 10.36233

The journal is a 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.

Articles by foreign authors, as well as articles specially recommended by the Editorial Board, are published in Russian and English under the same DOI.

The journal is presented in the following research databases: Russian Science Citation Index (RSCI) database, integrated in Web of Science; the databases of EBSCO Publishing (on the EBSCOhost platform).

Index for subscription to the printed version of the journal: catalog "Newspapers and Journals": 71420.
catalog "Subscription Press": E71436.

Full texts of issues of the journal are available:

<https://www.microbiol.elpub.ru/>;
<https://www.elibrary.ru/>;
<https://www.cyberleninka.ru/>;
<https://www.rucont.ru/>;
<https://www.ebsco.com>.

PUBLISHER:

Central Research Institute for Epidemiology, 197101, 3A, Novogireevskaya St., Moscow, Russian Federation.
Phone/fax: +7(495) 974-96-46.
E-mail: crie@pcr.ru

EDITORIAL OFFICE:

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

Head of the Editorial and publishing department:

Olga V. Osokina

Head of Editorial Office:

Olga V. Ustinkova.

The Editorial Board is not responsible for the advertising content.

The materials that do not meet the requirements of the journal (www.microbiol.elpub.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.elpub.ru/jour>).

Signed to the press on March 31, 2020.
Print format 60×90^{1/8}.
Circulation 250 copies.

Produced at the Buki Vedi Printing House.
115093, 1, 1st Party lane, Moscow, Russian Federation.
E-mail: info@bukivedi.com.
www.bukivedi.com

© Central Research Institute for Epidemiology, 2020

EDITORIAL BOARD:

Editor-in-Chief

Vitaly V. Zverev, D. Sci. (Med.), Professor, Academician of RAS, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Deputy editor

Tatiana A. Semenenko, D. Sci. (Med.), Professor, Head of the Epidemiology Department, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Executive Secretary

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

Editorial board

Vasily G. Akimkin, D. Sci. (Med.), Professor, Academician of RAS, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia

Nikolay I. Briko, D. Sci. (Med.), Professor, Academician of RAS, Institute of Public Health, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Elena B. Brusina, D. Sci. (Med.), Professor, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russia

Oleg V. Bukharin, D. Sci. (Med.), Professor, Academician of RAS, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russia

Sergey V. Cherkasov, D. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member of RAS, Orenburg Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russia

Aleksandr L. Gintsburg, D. Sci. (Med.), Professor, Academician of RAS, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Oleg P. Zhirnov, D. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member of RAS, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia

Alexander V. Karaulov, D. Sci. (Med.), Professor, Academician of RAS, Institute of Clinical Medicine, Institute of Molecular Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Vladimir V. Kutyrev, D. Sci. (Med.), Professor, Academician of RAS, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky, Saratov, Russia

Yuri V. Lobzin, D. Sci. (Med.), Professor, Academician of RAS, Children's Scientific and Clinical Center for Infectious Diseases, St. Petersburg, Russia

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

Rinat A. Maksyutov, D. Sci. (Med.), Institution of Virology and Biotechnology State Scientific Center (Vector), Novosibirsk, Russia

Victor V. Maleev, D. Sci. (Med.), Professor, Academician of RAS, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia

Mikhail I. Mikhaylov, D. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member of RAS, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Institute of Molecular and Personalized Medicine, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia, Belgorod State University, Belgorod, Russia

Gennadiy G. Onishchenko, D. Sci. (Med.), Professor, Academician of RAS, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Valentin I. Pokrovskiy, D. Sci. (Med.), Professor, Academician of RAS, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia

Oxana A. Svitich, D. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member of RAS, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Vladimir P. Sergiev, D. Sci. (Med.), Professor, Academician of RAS, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Valentina A. Sharkova, D. Sci. (Med.), Professor, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia

Igor S. Tartakovsky, D. Sci. (Med.), Professor, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia

Arg A. Totolian, D. Sci. (Med.), Professor, Academician of RAS, Saint-Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia

Leonid V. Urivayev, D. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member of RAS, D.I. Ivanovskiy Virology Institute, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia

Nikolay N. Filatov, D. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member of RAS, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Sergey V. Cherkasov, D. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member of RAS, Orenburg Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russia

Foreign members of the editorial Board

Shubhada Bopagama, 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, Vice-president of the European Academy of Natural Sciences, President of the R. Koch Medical Society (Germany), Chairman of German–Russian Koch–Mechnikov Forum, Berlin, Germany

Werner Lubitz, MSc, PhD, Professor, VP R&D, Founder, Biotech Innovation Research Development & Consulting, Vienna, Austria

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

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

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

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Миронов К.О., Корчагин В.И., Михайлова Ю.В., Янушевич Ю.Г., Шеленков А.А., Чагарян А.Н., Иванчик Н.В., Козлов Р.С., Акимкин В.Г.

Характеристика штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от больных инвазивными пневмококковыми инфекциями, с использованием высокопроизводительного секвенирования* 113

Христова Д., Кандова Я., Николов Г., Петрунов Б.

Сенсибилизация к аллергенам плесневых грибов у пациентов с респираторной аллергией. Оптимизация диагностического процесса* 119

Нагиева Ф.Г., Баркова Е.П., Стрелева А.Д., Сидоров А.В., Лотте В.Д., Зверев В.В.

Характеристика связывания вакцинных штаммов вируса *Varicella zoster* с препаратами мембранных рецепторов мозга мышей* 125

Зайцев Е.М., Бажанова И.Г., Брицина М.В., Мерцалова Н.У., Озерецковская М.Н.

Бесклеточная коклюшная вакцина из антигенов свежесывающегося штамма *B. pertussis* серовара 1.2.3 134

Алимов А.В., Смирнова С.С., Леленкова Е.В., Маркарян А.Ю., Вялых И.В.,

Веревищников В.К., Комиссаров А.Б., Соминина А.А.
Роль вирусов гриппа в развитии тяжелых форм острых респираторных инфекций у пациентов, госпитализированных в стационары г. Екатеринбурга в эпидемический сезон 2017–2018 г. 140

ОБЗОРЫ

Леонова Г.Н.

Клещевой энцефалит в Дальневосточном очаговом регионе евразийского континента 150

Пименова Е.В., Храпова Н.П., Замарина Т.В.

Модели *in vitro* для изучения вируса Зика 159

Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М., Титова С.В.

Экологические особенности персистенции холерных вибрионов: ретроспективный анализ и современное состояние проблемы 165

ДИСКУССИИ

Михеева М.А., Михеева И.В.

Динамика рейтинга экономического ущерба от инфекционных болезней как критерий эффективности эпидемиологического контроля* 174

НАУКА И ПРАКТИКА

Игнатьев Г.М., Отрашевская Е.В., Суханова Л.Л., Сидоренко Е.С., Нетесова Н.А.

Молекулярно-генетическое исследование штамма Ленинград-16, используемого для производства вакцины кори 182

* Статья опубликована на русском и английском языках.

CONTENTS

ORIGINAL RESEARCHES

- Mironov K.O., Korchagin V.I., Mikhailova Y.V., Yanushevich Y.G., Shelenkov A.A., Chagaryan A.N., Ivanchik N.V., Kozlov R.S., Akimkin V.G.**
Characterization of *Streptococcus pneumoniae* strains causing invasive infections using whole-genome sequencing* 113
- Hristova D., Kandova Ya., Nikolov G., Petrunov B.**
Sensitization to fungal allergens in patients with respiratory allergy – accuracy in diagnostic process* 119
- Nagieva F.G., Barkova E.P., Stroeveva A.D., Sidorov A.V., Lotte V.D., Zverev V.V.**
Characterization of binding of *Varicella zoster* virus vaccine strains to preparations of mouse brain membrane receptors* 125
- Zaitsev E.M., Bazhanova I.G., Britsina M.V., Mertsalova N.U., Ozeretskovskaya M.N.**
Cell-free pertussis vaccine from antigens of freshly isolated strain of *B. pertussis* serotype 1.2.3 134
- Alimov A.V., Smirnova S.S., Lelenkova E.V., Markaryan A.Yu., Vyalykh I.V., Verevshchikov V.K., Komissarov A.B., Sominina A.A.**
The role of influenza viruses in the development of severe acute respiratory infection in patients admitted to Yekaterinburg hospitals during 2017–2018 epidemic season 140

REVIEWS

- Leonova G.N.**
Tick-borne encephalitis in the Far East focal region of the Eurasian continent 150
- Pimenova E.V., Khrapova N.P., Zamarina T.V.**
In vitro models for the study of Zika virus 159
- Menshikova E.A., Kurbatova E.M., Titova S.V.**
Ecological features of the persistence of *Vibrio cholerae*: retrospective analysis and actual state of the problem 165

DISCUSSIONS

- Mikheeva M.A., Mikheeva I.V.**
Ranking dynamics of economic burden of infectious diseases as a criterion of effectiveness of epidemiologic control* 174

SCIENCE AND PRACTICE

- Ignatyev G.M., Atrasheuskaya A.V., Sukhanova L.L., Sidorenko E.S., Netesova N.A.**
Molecular genetic analysis of the strain Leningrad-16 used for the production of measles vaccine 182

* This article is published in Russian and English.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Миронов К.О., Корчагин В.И., Михайлова Ю.В., Янушевич Ю.Г., Шеленков А.А., Чагарян А.Н., Иванчик Н.В., Козлов Р.С., Акимкин В.Г., 2020



Характеристика штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от больных инвазивными пневмококковыми инфекциями, с использованием высокопроизводительного секвенирования

Миронов К.О.^{1✉}, Корчагин В.И.¹, Михайлова Ю.В.¹, Янушевич Ю.Г.¹, Шеленков А.А.¹, Чагарян А.Н.², Иванчик Н.В.², Козлов Р.С.², Акимкин В.Г.¹

¹ФБУН «Центральный НИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, Москва, Россия;

²НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России, 214019, Смоленск, Россия

Цель работы — характеристика антигенных и генетических свойств штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от больных инвазивными формами пневмококковой инфекции, на основании данных высокопроизводительного секвенирования.

Материалы и методы. Исследовано 46 штаммов *S. pneumoniae*, выделенных при проведении многоцентровых исследований «ПеГАС» в течение 2015–2018 гг. Секвенирование проводилось с использованием реагентов и оборудования фирмы «Illumina». При обработке данных использовались программы «SPAdes» (Россия), «SeroBA» и «PneumoCaT», а также программные возможности PubMLST.org.

Результаты и обсуждение. Определены полногеномные последовательности штаммов, информация внесена в базу данных PubMLST (id: 51080–51125). У 10 (21%) штаммов найден серотип 3. По 5 (11%) штаммов принадлежали к серотипу 19F и серогруппе 6, из которых у 2 определен серотип 6A, по 1 — 6B и 6BE, у 1 был дискордантный результат (6A или 6BE). У 3 (6,5%) штаммов найден серотип 15B. Двукратно обнаружены серотипы 7F, 8, 9V, 14, 22F, 23F и 28A, однократно — 1, 4, 9N, 10C, 12F, 18C, 35F, 37 и 38. Доля штаммов с серотипами, входящими в состав PCV13, составляет 65%, в состав PPV23 — 80%. У штаммов установлено 36 сиквенс-типов, из которых 6 — впервые. Мультилокусное секвенирование-типирование не позволяет выявить преобладающий сиквенс-тип или определить клональные комплексы, за исключением штаммов серотипа 3. Невозможность обозначить клональные комплексы согласуется с полученными ранее данными об отсутствии выраженной клональной структуры *S. pneumoniae*, ассоциированных с пневмококковыми менингитами на территории России.

Заключение. С учетом эпидемиологических данных об источниках штаммов и информации о прививочном статусе полученные результаты позволяют оценить эффективность существующих пневмококковых вакцин в отношении инвазивных форм пневмококковых инфекций и предоставляют информацию для расширения возможностей основанных на ПЦР способов серотипирования.

Ключевые слова: *Streptococcus pneumoniae*; инвазивные пневмококковые инфекции; высокопроизводительное секвенирование; серотипирование; мультилокусное секвенирование-типирование.

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

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

Для цитирования: Миронов К.О., Корчагин В.И., Михайлова Ю.В., Янушевич Ю.Г., Шеленков А.А., Чагарян А.Н., Иванчик Н.В., Козлов Р.С., Акимкин В.Г. Характеристика штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от больных инвазивными пневмококковыми инфекциями, с использованием высокопроизводительного секвенирования. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(2): 113–118.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-113-118>

Поступила 20.02.2020
Принята в печать 27.02.2020

Characterization of *Streptococcus Pneumoniae* Strains Causing Invasive Infections Using Whole-Genome Sequencing

Konstantin O. Mironov¹✉, Vitaly I. Korchagin¹, Yuliya V. Mikhailova¹, Yurii G. Yanushevich¹, Andrey A. Shelenkov¹, Aida N. Chagaryan², Natali V. Ivanchik², Roman S. Kozlov², Vasily G. Akimkin¹

¹Central Research Institute of Epidemiology, 111123, Moscow, Russia;

²Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk State Medical University, 214019, Smolensk, Russia

Purpose: antigenic and genetic characterization of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from patients with invasive forms of pneumococcal infection using whole-genome sequencing.

Materials and Methods. The study was performed on 46 *S. pneumoniae* strains isolated during the PEHASus multicenter studies in 2015–2018. Sequencing was performed using Illumina protocols and equipment. The SPAdes, SeroBA, PneumoCaT software were used for data processing, as well as BIGSdb software (PubMLST.org).

Results and Discussion. Whole-genome sequences of strains were obtained; the information was entered into the PubMLST database (id: 51080–51125). Ten (21%) strains were found to have serotype 3. Five (11%) strains belonged to serotype 19F and five to serogroup 6; two of them belonged to serotype 6A; one strain had 6B and 1 had 6BE serotype; 1 strain showed discordant result (6A or 6BE). Serotype 15B was identified in 3 (6.5%) strains. Serotypes 7F, 8, 9V, 14, 22F, 23F and 28A were identified in two strains each; serotypes 1, 4, 9N, 10C, 12F, 18C, 35F, 37 and 38 were found once. The proportion of strains with serotypes included in PCV13 and PPV23 vaccines was 65% and 80%, respectively. 36 sequence types were found in strains; out of them, 6 sequence types were found for the first time. A dominant sequence type or clone complexes could not be identified using multilocus sequence typing except for serotype 3 strains. The inability to identify clonal complexes is in congruence with the previously obtained data on the absence of *S. pneumoniae* clones associated with pneumococcal meningitis in Russia.

Conclusion. The information about serotypes of *S. pneumoniae* causing invasive infections together with epidemiologic data about strain sources and vaccination allows us to evaluate the effectiveness of pneumococcal vaccines and provide information for improving the PCR-based routine serotyping.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*; invasive pneumococcal infection; high-throughput sequencing; serotyping; multilocus sequence typing; whole genome sequencing.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

For citation: Mironov K.O., Korchagin V.I., Mikhailova Y.V., Yanushevich Y.G., Shelenkov A.A., Chagaryan A.N., Ivanchik N.V., Kozlov R.S., Akimkin V.G. Characterization of *Streptococcus pneumoniae* strains causing invasive infections using whole-genome sequencing. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(2): 113–118. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-113-118>

Received 20 February 2020
Accepted 27 February 2020

Введение

Бактерии вида *Streptococcus pneumoniae* являются возбудителями пневмококковых инфекций (ПИ), которые подразделяют на неинвазивные и инвазивные [1]. Наиболее часто диагностируемые инвазивные формы ПИ — гнойный бактериальный менингит, бактериемическая пневмония и сепсис. Распространенными способами внутривидовой характеристики *S. pneumoniae* являются антигенная характеристика полисахарида капсулы — определение серогрупп или серотипов, которых описано более 90, и генетическая характеристика с помощью мультилокусного секвенирования-типирования (МЛСТ) [2, 3]. Диагностика инвазивных ПИ и характеристика вызвавших их возбудителей является не только актуальной клинической задачей, направленной на выбор тактики лечения, но и важным элементом эпидемиологического надзора, позволяю-

щим охарактеризовать вклад тех или иных возбудителей в структуру общей заболеваемости ПИ и осуществлять планирование профилактических мероприятий, основным из которых является вакцинация [1]. В настоящее время в России широкое применение получили 13-валентная конъюгированная пневмококковая вакцина (PCV13, «Превенар 13») и 23-валентная полисахаридная вакцина (PPV23, «Пневмовакс 23»).

Определение серотипов *S. pneumoniae* может быть проведено с применением серологических методов — реакции набухания капсулы или латекс-агглютинации, например с помощью факторных антисывороток или набора реагентов «Pneumotest-Latex» (Statens Serum Institut, Дания). Поскольку нуклеотидные последовательности генов (*cps*-локус), кодирующих синтез и сборку капсульного полисахарида, известны [4], существует возможность

определения серогрупп и серотипов методом ПЦР с праймерами для амплификации серотип-специфических мишеней в геноме *S. pneumoniae*. В частности, широко распространены подходы, рекомендованные Центрами по контролю и профилактике заболеваний США [5] для определения 40 серотип-специфических мишеней, в основе которых — работа R. Pai и соавт. [6]. В ЦНИИ Эпидемиологии разработана и применяется 4-плексная методика для определения 16 серотипов с помощью ПЦР в режиме реального времени (методика включает все серотипы, входящие в PCV13) [7]. Полученные проспективные данные о серогрупповом составе возбудителей также могут определять тактику лабораторных исследований, направленных на установку антигенных особенностей возбудителей отдельных форм ПИ, циркулирующих в текущий момент времени.

Микробиологический мониторинг штаммов, вызывающих различные формы ПИ, с помощью метода МЛСТ является важной практической задачей, направленной на определение генетических особенностей циркулирующих штаммов и своевременное выявление резистентных возбудителей или штаммов с повышенными вирулентными свойствами, возникающих в результате рекомбинационных процессов или импортируемых, с целью мониторинга их распространения [2]. Основным преимуществом МЛСТ перед другими молекулярно-биологическими методами типирования является возможность объединения данных через интернет-ресурс PubMLST.org [3].

Использование серологических и основанных на ПЦР методов не всегда позволяет охарактеризовать все многообразие существующих возбудителей ПИ, вынужденных постоянно адаптироваться под давлением популяционного иммунитета. В то же время полногеномный анализ дает возможность получать исчерпывающие данные об антигенных и генетических свойствах возбудителей, которые в том числе могут быть использованы при разработке и совершенствовании существующих основанных на ПЦР подходов для определения серотипов. В связи с этим **цель** данной работы заключалась в характеристике антигенных и генетических свойств штаммов *S. pneumoniae*, ассоциированных с инвазивными формами ПИ, на основании данных высокопроизводительного секвенирования.

Материалы и методы

Использовано 46 штаммов *S. pneumoniae*, выделенных из крови ($n = 10$) и спинномозговой жидкости ($n = 36$) больных инвазивными формами ПИ при проведении многоцентровых исследований «ПеГАС» [8] в 2015–2018 гг. Транспортировка штаммов в центральную лабораторию (НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России) осуществлялась на среде Дорсе.

В центральной лаборатории проводилась видовая идентификация штаммов. Штаммы высевались на кровяной агар «BioMedia» (Россия), их идентификация микробиологическими методами (учет морфологии колоний, наличие α -гемолиза, результат отрицательной каталазной реакции, определение чувствительности к оптохину) подтверждалась в реакции латекс-агглютинации с использованием набора «Slidex Pneumo-Kit» («bioMerieux»). Для видовой идентификации штаммов также применялся метод времяпролетной масс-спектрометрии с использованием реагентов и оборудования фирмы «Bruker Daltonics». Все штаммы хранили в пробирках с триптиказо-соевым бульоном («bioMerieux») с добавлением 30% стерильного глицерина («Sigma») при -70°C .

ДНК выделяли с использованием набора «DNeasy Blood & Tissue Kits» («Qiagen»). Секвенирование проводили в отделе молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии». Концентрацию полученных образцов ДНК измеряли на приборе «Qubit 4.0» с помощью «Qubit dsDNA HS Assay Kit» («Thermo Fisher Scientific»), для пробоподготовки использовали 40 нг геномной ДНК. Пробоподготовку проводили по протоколу «Nextera» («Illumina»). Индексированные полногеномные библиотеки пулировались в эквимольном соотношении, пулы очищались и отбирались по длине с помощью «SpeedBeads Magnetic Carboxylate Modified Particles» («GE Healthcare»). Качество пулов проверяли с помощью «High Sensitivity DNA Kit» («Agilent»). Высокопроизводительное секвенирование осуществляли на приборе «HiSeq 1500» с использованием наборов «HiSeq PE Rapid Cluster Kit v2» и «HiSeq Rapid SBS Kit v2» («Illumina»).

Сборку полногеномных нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программы «SPAdes» версии 3.13 (Россия) [9]. Для определения серотипов *S. pneumoniae* использовали программы «SeroBA» [10] и «PneumoCaT» [11]. Обозначение аллелей и сиквент-типов проведено в соответствии со схемой МЛСТ для бактерий вида *S. pneumoniae* [2]. При обработке результатов секвенирования и МЛСТ использовались биоинформационные возможности интернет-ресурса PubMLST.org [3]. На момент окончания исследования база данных PubMLST [12] содержала результаты типирования около 48 тыс. изолятов, включая более 14 тыс. полногеномных последовательностей *S. pneumoniae*, из которых 19 были получены при секвенировании российских изолятов, ассоциированных преимущественно с неинвазивными формами ПИ.

Результаты

Определены полногеномные нуклеотидные последовательности всех штаммов, включенных в исследование. Подробная информация о штаммах,

содержащая фенотипические характеристики: серотип, чувствительность к антибиотикам (для 38 штаммов) и данные об источнике (год, территория, возраст, форма ПИ), внесена в базу данных PubMLST [12]; штаммам присвоены номера (id): 51080–51125. База данных PubMLST также содержит информацию об оценке качества сборки полногеномных последовательностей (N50, L50, N90 и другие параметры) секвенированных штаммов.

В результате анализа полногеномных данных с использованием двух алгоритмов [10, 11] удалось определить серотиповую принадлежность всех изученных штаммов. У 10 (21%) штаммов установлен серотип 3. По 5 (11%) штаммов принадлежали серотипу 19F и серогруппе 6, из которых у 2 штаммов определен серотип 6A, по одному — 6B и 6BE и у одного (id-51089) — дискордантный результат: 6A или 6BE. У 3 (6,5%) штаммов выявлен серотип 15B. Двукратно найдены серотипы 7F, 8, 9V, 14, 22F, 23F и 28A, однократно — 1, 4, 9N, 10C, 12F, 18C, 35F, 37 и 38.

Для всех штаммов проведено обозначение 7 аллелей и определены сиквенс-типы [2]. Найдено 6 не описанных ранее сиквенс-типов: ST-15247–15250 (образованы не встречавшимися ранее комбинациями аллелей), ST-15251 и ST-15252 (содержат в аллельном профиле впервые найденные аллели agoE-510 и хрт-924 соответственно).

Обсуждение

Используемые до настоящего времени в отечественной практике способы определения серотипов *S. pneumoniae*, ассоциированных с инвазивными ПИ, основанные на применении серологических реакций, ПЦР или сочетаний обоих подходов, не позволяли проводить характеристику всех анализируемых штаммов или клинических образцов, содержащих ДНК инкапсулированных (ср-положительных) изолятов, в полном объеме. Это связано как с ограниченным набором используемых в методиках антител или серотип-специфических мишеней, так и с возможными ложноотрицательными результатами, что не позволяет охарактеризовать все антигенное многообразие возбудителей, способных вызывать ПИ. Например, с использованием основанной на ПЦР методики [7] при характеристике 89 образцов спинномозговой жидкости от больных пневмококковым менингитом, выделенных в 2007–2010 гг. в Москве, удалось определить серотип в 79% случаев; в этом же исследовании применение дополнительных серотип-специфических мишеней с альтернативными праймерами [5, 6] не позволило качественно увеличить долю определяемых серотипов. При использовании той же методики для изучения 235 штаммов и биологических образцов, полученных от больных пневмококковым менингитом в 2010–2014 гг. на территории России, удалось оха-

актеризовать почти такую же долю возбудителей — 76% [13]. Это примерно на 10% больше, чем доля штаммов, серотип которых удалось бы определить в данном исследовании: использование методики [7] позволило бы выявить серотип у 31 (67%) штамма.

Распределение и относительное соотношение серотипового состава циркулирующих возбудителей могут варьировать в зависимости от эпидемиологических особенностей, которые в том числе включают применение тех или иных поливалентных вакцин. Для штаммов, охарактеризованных в данном исследовании, доля случаев, обусловленных серотипами, входящими в состав PCV13, составляет 65%, в состав PPV23 — 80%. Уменьшение в 2015–2018 гг. доли случаев инвазивных ПИ, вызванных серотипами *S. pneumoniae* из состава PCV13, может быть связано с увеличением охвата вакцинацией и, возможно, с введением пневмококковой вакцины в календарь профилактических прививок в 2014 г. В то же время, несмотря на то что вакцины PCV13 и PPV23 содержат серотипы 3, 6 и 19F, среди охарактеризованных штаммов эти серотипы встречаются чаще других, как и в предыдущие годы [1, 13]. На особенность исследованной выборки также указывает относительно высокая доля штаммов с серотипом 15B и присутствие штаммов с серотипами 28A, 37 и 38, которые ранее не были ассоциированы с пневмококковыми менингитами на территории России.

С учетом эпидемиологических данных об источниках штаммов и информации о прививочном статусе полученные результаты позволяют оценить эффективность существующих пневмококковых вакцин в отношении инвазивных форм ПИ, а также диктуют необходимость расширения возможностей основанных на ПЦР способов определения серотипов [7] за счет использования дополнительных серотип-специфических мишеней, ориентированных главным образом на детекцию *S. pneumoniae* серотипов 15B, 8, 22F и 12F.

В охарактеризованной выборке штаммов найдено 36 сиквенс-типов. Основанный на MLST анализ не позволяет выявить преобладающий сиквенс-тип или определить клональные комплексы, за исключением штаммов серотипа 3, для которых характерно образование клонального комплекса, объединяющего сиквенс-типы ST-180 (5 штаммов), ST-505 (2 штамма) и ST-2049, ST-15250, ST-15251 (по 1 штамму). Сопоставление найденных сиквенс-типов с сиквенс-типами 108 изолятов, выделенных от больных пневмококковым менингитом на территории России в других исследованиях, данные о которых были опубликованы в PubMLST [12], демонстрирует присутствие в обеих выборках у штаммов с серотипом 3 сиквенс-типов ST-180 и ST-505, у штаммов других серотипов — сиквенс-типов ST-236, ST-239 и ST-1262, остальные сиквенс-типы не совпадали с найденными ранее. Невозможность

обозначить клональные комплексы в охарактеризованной выборке штаммов, относительно высокая частота впервые обнаруженных сиквенс-типов (6 из 36) и несовпадение подавляющего большинства выявленных сиквенс-типов с найденными на наблюдаемой территории в предыдущие годы, согласуются с полученными ранее данными об отсутствии выраженной клональной структуры *S. pneumoniae*, ассоциированных с пневмококковыми менингитами на территории России [1].

В целом результаты полногеномного секвенирования позволяют получать исчерпывающую информацию об антигенных и генетических свойствах *S. pneumoniae*, циркулирующих в данный момент времени. Дальнейшее использование полногеномных данных должно быть направлено на анализ эволюционных процессов и генетических взаимоотношений охарактеризованных штаммов со штаммами, выделяемыми при других ПИ на основании МЛСТ, проведенного по «основному» геному (core genome), а также на анализ генетических факторов, определяющих устойчивость к антибиотикам и механизмы развития резистентности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Покровский В.И., Творогова М.Г., Шипулин Г.А., ред. *Молекулярная диагностика инфекционных болезней*. М.: РИПОЛ классик; 2018.
2. Enright M.C., Spratt B.G. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology*. 1998; 144 (Pt. 11): 3049-60.
DOI: <http://doi.org/10.1099/00221287-144-11-3049>
3. 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: <http://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>
4. Bentley S.D., Aanensen D.M., Mavroidi A., Saunders D., Rabinowitsch E., Collins M., et al. Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS Genet*. 2006; 2(3): e31.
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020031>
5. Conventional PCR deduction of 40 pneumococcal serotypes or serogroups. Available at: <http://www.cdc.gov/streplab/pcr.html> (Accessed 17.02.2020)
6. Pai R., Gertz R.E., Beall B. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(1): 124-31.
DOI: <http://doi.org/10.1128/JCM.44.1.124-131.2006>
7. Миронов К.О., Платонов А.Е., Дунаева Е.А., Кусева В.И., Шипулин Г.А. Методика ПЦР в режиме реального времени для определения серотипов *Streptococcus pneumoniae*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2014; 91(1): 41-8.
8. Иванчик Н.В., Чагарян А.Н., Сухорукова М.В., Козлов Р.С., Дехнич А.В., Кречикова О.И. и др. Антибиотикорезистентность клинических штаммов *Streptococcus pneumoniae* в России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «ПеГАС 2014–2017». *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2019; 21(3): 230-37.
DOI: <http://doi.org/10.36488/cmasc.2019.3.230-237>
9. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., et al. SPAdes: A new genome assembly algorithm

and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012; 19(5): 455-77.

DOI: <http://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>

10. Epping L., van Tonder A.J., Gladstone R.A., Bentley S.D., Page A.J., Keane J.A. The Global Pneumococcal Sequencing Consortium. SeroBA: rapid high-throughput serotyping of *Streptococcus pneumoniae* from whole genome sequence data. *Microb. Genom.* 2018; 4(7): e000186.
DOI: <http://doi.org/10.1099/mgen.0.000186>
11. Kapatai G., Sheppard C.L., Al-Shahib A., Litt D.J., Underwood A.P., Harrison T.G., et al. Whole genome sequencing of *Streptococcus pneumoniae*: development, evaluation and verification of targets for serogroup and serotype prediction using an automated pipeline. *PeerJ*. 2016; 4: e2477.
DOI: <http://doi.org/10.7717/peerj.2477>
12. Streptococcus pneumoniae MLST Databases. Available at: <https://pubmlst.org/spneumoniae/> (Accessed 17.02.2020)
13. Белошицкий Г.В., Королева И.С., Королева М.А. Серотиповой пейзаж пневмококков, выделенных при пневмококковом менингите в Российской Федерации. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2015; 14(2): 19-25.

REFERENCES

1. Pokrovskiy V.I., Tvorogova M.G., Shipulin G.A., eds. *Molecular Diagnostics of Infectious Diseases [Molekulyarnaya diagnostika infektsionnykh bolezney]*. Moscow: RIPOL klassic; 2018. (in Russian)
2. Enright M.C., Spratt B.G. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology*. 1998; 144(Pt. 11): 3049-60.
DOI: <http://doi.org/10.1099/00221287-144-11-3049>
3. 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: <http://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>
4. Bentley S.D., Aanensen D.M., Mavroidi A., Saunders D., Rabinowitsch E., Collins M., et al. Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS Genet*. 2006; 2(3): e31.
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020031>
5. Conventional PCR deduction of 40 pneumococcal serotypes or serogroups. Available at: <http://www.cdc.gov/streplab/pcr.html> (Accessed 17.02.2020)
6. Pai R., Gertz R.E., Beall B. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(1): 124-31.
DOI: <http://doi.org/10.1128/JCM.44.1.124-131.2006>
7. Mironov K.O., Platonov A.E., Dunaeva E.A., Kuseva V.I., Shipulin G.A. Real-time PCR procedure for determination of *Streptococcus pneumoniae* serotypes. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2014; 91(1): 41-8. (in Russian)
8. Ivanchik N.V., Chagaryan A.N., Sukhorukova M.V., Kozlov R.S., Dekhnic A.V., Krechikova O.I., et al. Antimicrobial resistance of clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates in Russia: the results of multicenter epidemiological study «PEHASus 2014–2017». *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2019; 21(3): 230-37.
DOI: <http://doi.org/10.36488/cmasc.2019.3.230-237> (in Russian)
9. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., et al. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012; 19(5): 455-77.
DOI: <http://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
10. Epping L., van Tonder A.J., Gladstone R.A., Bentley S.D., Page A.J., Keane J.A. The Global Pneumococcal Sequencing

Consortium. SeroBA: rapid high-throughput serotyping of *Streptococcus pneumoniae* from whole genome sequence data. *Microb. Genom.* 2018; 4(7): e000186.

DOI: <http://doi.org/10.1099/mgen.0.000186>

11. Kapatai G., Sheppard C.L., Al-Shahib A., Litt D.J., Underwood A.P., Harrison T.G., et al. Whole genome sequencing of *Streptococcus pneumoniae*: development, evaluation and verification of targets for serogroup and serotype prediction using an

automated pipeline. *PeerJ.* 2016; 4: e2477.

DOI: <http://doi.org/10.7717/peerj.2477>

12. Streptococcus pneumoniae MLST Databases. Available at: <https://pubmlst.org/spneumoniae/> (Accessed 17.02.2020)
13. Beloshitskiy G.V., Koroleva I.S., Koroleva M.A. Landscape of serotypes pneumococcus isolate with pneumococcal meningitis in the Russian Federation. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika.* 2015; 14(2): 19-25. (in Russian)

Информация об авторах:

Миронов Константин Олегович  — д.м.н., рук. научной группы разработки новых методов выявления генетических полиморфизмов ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии», 111123, Москва, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8207-9215>.

E-mail: mironov@pcr.ru

Корчагин Виталий Иванович — к.б.н., н.с. научной группы разработки новых методов выявления генетических полиморфизмов ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии», 111123, Москва, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2264-6294>

Михайлова Юлия Владимировна — к.б.н., руководитель научной группы новых технологий молекулярного анализа ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии», 111123, Москва, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5646-538X>

Янушевич Юрий Григорьевич — н.с. научной группы новых технологий молекулярного анализа ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии», 111123, Москва, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9061-752X>

Шеленков Андрей Александрович — к.ф.-м.н., н.с. научной группы новых технологий молекулярного анализа ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии», 111123, Москва, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7409-077X>

Чажарян Аида Нуримановна — к.б.н., н.с. лаборатории молекулярной диагностики НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ, 214019, Смоленск, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9195-8764>

Иванчик Натали Владимировна — к.м.н., н.с. лаборатории антибиотикорезистентности НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ, 214019, Смоленск, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9392-0732>

Козлов Роман Сергеевич — д.м.н., проф., директор НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ, 214019, Смоленск, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8728-1113>

Акимкин Василий Геннадьевич — д.м.н., проф., акад. РАН, директор ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии», 111123, Москва, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8139-0247>

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Information about the authors:

Konstantin O. Mironov  — Doct. Sci. (Med.), Head, Scientific group of developing new genetic polymorphisms detection methods, Central Research Institute for Epidemiology, 111123, Moscow, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8207-9215>.

E-mail: mironov@pcr.ru

Vitaly I. Korchagin — PhD (Biol.), researcher, Scientific group of developing new genetic polymorphisms detection methods, Central Research Institute for Epidemiology, 111123, Moscow, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2264-6294>

Yuliya V. Mikhailova — PhD (Biol.), Head, Scientific group of novel techniques for molecular analysis, Central Research Institute for Epidemiology, 111123, Moscow, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5646-538X>

Yurii G. Yanushevich — researcher, Scientific group of novel techniques for molecular analysis, Central Research Institute for Epidemiology, 111123, Moscow, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9061-752X>

Andrey A. Shelonkov — PhD (Phys.-Math.), researcher, Scientific group of novel techniques for molecular analysis, Central Research Institute for Epidemiology, 111123, Moscow, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7409-077X>

Aida N. Chagaryan — PhD (Biol.), researcher, Molecular diagnostics laboratory, Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk State Medical University, 214019, Smolensk, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9195-8764>

Natali V. Ivanchik — PhD (Med.), researcher, Antibiotic resistance laboratory, Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk State Medical University, 214019, Smolensk, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9392-0732>

Roman S. Kozlov — Doct. Sci. (Med.), Prof., Director, Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk State Medical University, 214019, Smolensk, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8728-1113>

Vasily G. Akimkin — Doct. Sci. (Med.), Prof., Academician of the Russian Academy of Sciences, Director, Central Research Institute for Epidemiology, 111123, Moscow, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8139-0247>

Contribution: the authors contributed equally to this article.



Characterization of *Streptococcus Pneumoniae* Strains Causing Invasive Infections Using Whole-Genome Sequencing

Konstantin O. Mironov¹✉, Vitaly I. Korchagin¹, Yuliya V. Mikhailova¹, Yuri G. Yanushevich¹,
Andrey A. Shelenkov¹, Aida N. Chagaryan², Natali V. Ivanchik², Roman S. Kozlov²,
Vasily G. Akimkin¹

¹Central Research Institute of Epidemiology, 111123, Moscow, Russia;

²Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk State Medical University, 214019, Smolensk, Russia

Purpose: antigenic and genetic characterization of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from patients with invasive forms of pneumococcal infection using data of *high-throughput sequencing*.

Materials and Methods. The study was performed on 46 *S. pneumoniae* strains isolated during the PEHASus multicenter studies in 2015–2018. Sequencing was performed using Illumina protocols and equipment. The SPAdes, SeroBA, PneumoCaT software were used for data processing, as well as BIGSdb software (PubMLST.org).

Results and Discussion. Whole-genome sequences of strains were identified; the information was entered into the PubMLST database (id: 51080–51125). Ten (21%) strains were found to have serotype 3. Five (11%) strains belonged to serotype 19F and five to serogroup 6; two of them belonged to serotype 6A; one strain had 6B and 1 had 6BE serotype; 1 strain showed discordant result (6A or 6BE). Serotype 15B was identified in 3 (6.5%) strains. Serotypes 7F, 8, 9V, 14, 22F, 23F and 28A were identified in two strains each; serotypes 1, 4, 9N, 10C, 12F, 18C, 35F, 37 and 38 were found once. The proportion of strains with serotypes included in PCV13 and PPV23 vaccines was 65% and 80%, respectively. 36 sequence types were found in strains; out of them, 6 sequence types were found for the first time. A dominant sequence type or clone complexes could not be identified using multilocus sequence typing except for serotype 3 strains. The failure to identify clone complexes is consistent with the data of previous studies that demonstrated the absence of a pronounced clone structure of *S. pneumoniae* associated with pneumococcal meningitis in Russia.

Conclusion. The information about serotypes of *S. pneumoniae* causing invasive infections together with epidemiologic data about strain sources and vaccination allows us to evaluate the effectiveness of pneumococcal vaccines and provide information for improving the PCR-based routine serotyping.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*; *invasive pneumococcal infection*; *high-throughput sequencing*; *serotyping*; *multilocus sequence typing*; *whole genome sequencing*.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

For citation: Mironov K.O., Korchagin V.I., Mikhailova Y.V., Yanushevich Y.G., Shelenkov A.A., Chagaryan A.N., Ivanchik N.V., Kozlov R.S., Akimkin V.G. Characterization of *Streptococcus Pneumoniae* Strains Causing Invasive Infections Using Whole-Genome Sequencing. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, épidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(2): 113–118. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-113-118>

Received 20 February 2020

Accepted 27 February 2020

Характеристика штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от больных инвазивными пневмококковыми инфекциями, с использованием высокопроизводительного секвенирования

Миронов К.О.¹✉, Корчагин В.И.¹, Михайлова Ю.В.¹, Янушевич Ю.Г.¹, Шеленков А.А.¹,
Чагарян А.Н.², Иванчик Н.В.², Козлов Р.С.², Акимкин В.Г.¹

¹ФБУН «Центральный НИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, Москва, Россия;

²НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России, 214019, Смоленск, Россия

Цель работы — характеристика антигенных и генетических свойств штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от больных инвазивными формами пневмококковой инфекции, на основании данных высокопроизводительного секвенирования.

Материалы и методы. Исследовано 46 штаммов *S. pneumoniae*, выделенных при проведении многоцентровых исследований «ПеГАС» в течение 2015–2018 гг. Секвенирование проводилось с использованием реагентов и оборудования фирмы «Illumina». При обработке данных использовались программы «SPAdes» (Россия), «SeroVA» и «PneumoCaT», а также программные возможности PubMLST.org.

Результаты и обсуждение. Определены полногеномные последовательности штаммов, информация внесена в базу данных PubMLST (id: 51080–51125). У 10 (21%) штаммов найден серотип 3. По 5 (11%) штаммов принадлежали серотипу 19F и серогруппе 6, из которых у 2 определен серотип 6A, по 1 — 6B и 6BE, и у 1 — дискордантный результат (6A или 6BE). У 3 (6,5%) штаммов найден серотип 15B. Двукратно найдены серотипы 7F, 8, 9V, 14, 22F, 23F и 28A, однократно — 1, 4, 9N, 10C, 12F, 18C, 35F, 37 и 38. Доля штаммов с серотипами, входящими в состав PCV13, составляет 65%, и в состав PPV23 — 80%. У штаммов найдено 36 сиквенса-типов, из которых 6 — впервые. Мультилокусное секвенирование-типирование не позволяет выявить преобладающий сиквенса-тип или определить клональные комплексы, за исключением штаммов серотипа 3. Невозможность обозначить клональные комплексы согласуется с полученными ранее данными об отсутствии выраженной клональной структуры *S. pneumoniae*, ассоциированных с пневмококковыми менингитами на территории России.

Заключение. С учетом эпидемиологических данных об источниках штаммов и информации о прививочном статусе полученные результаты позволяют оценить эффективность существующих пневмококковых вакцин в отношении инвазивных форм пневмококковых инфекций и предоставляют информацию для расширения возможностей основанных на ПЦР способов серотипирования.

Ключевые слова: *Streptococcus pneumoniae*; инвазивные пневмококковые инфекции; высокопроизводительное секвенирование; серотипирование; мультилокусное секвенирование-типирование.

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

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

Для цитирования: Миронов К.О., Корчагин В.И., Михайлова Ю.В., Янушевич Ю.Г., Шеленков А.А., Чагарян А.Н., Иванчик Н.В., Козлов Р.С., Акимкин В.Г. Характеристика штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от больных инвазивными пневмококковыми инфекциями, с использованием высокопроизводительного секвенирования. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(2): 113–118.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-113-118>

Поступила 20.02.2020

Принята в печать 27.02.2020

Introduction

Streptococcus pneumoniae bacteria are the most common cause of pneumococcal infections (PI), which are divided into noninvasive and invasive [1]. The most frequently diagnosed invasive PI forms are purulent bacterial meningitis, bacteremic pneumonia and sepsis. The most frequently used methods of intraspecific characterization of *S. pneumoniae* are antigenic characterization of capsular polysaccharide — identification of serogroups or serotypes, the number of which exceeds 90, and genetic characterization using multilocus sequence typing (MLST) [2, 3]. Diagnostics of invasive PI and characterization of the corresponding viruses are not only a top-priority clinical task implying targeted therapy, but also an important component of the epidemiological surveillance, as they make it possible to estimate the contribution of particular pathogens to the overall PI incidence and to develop preventive measures, the main one being vaccination [1]. At present, in Russia the widely used vaccines are 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13, Prevenar 13®) and a 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PPV23, PNEUMOVAX®23).

S. pneumoniae serotypes can be identified by serological methods — a quellung reaction or a latex agglutination test, using, for example, factor antisera or a Pneumotest-Latex reagent kit (Statens Serum Institut, Denmark). As nucleotide sequences of genes (*cps*-locus) encoding the synthesis and assembly of capsular polysaccharides are known [4], there is a possibility of identifying serogroups and serotypes using the PCR method and primers for amplification of serotype-specific targets in the *S. pneumoniae* genome. More specifically, researchers tend to use most frequently the approaches recommended by the US Centers for Disease Control and Prevention [5] for identifying 40 serotype-specific targets; the approaches are based on studies of R. Pai et al. [6]. The Central Research Institute of Epidemiology developed and uses a multiplex procedure for identifying 16 serotypes using real-time PCR (this method identifies all serotypes included in PCV13) [7]. The prospective data on the serogroup composition of pathogens can also determine the tactics of laboratory-based identification of antigenic characteristics of currently circulating etiologic agents of PI.

The microbiological monitoring of strains causing different PI forms with the help of the MLST

method is an important practical task aimed at the identification of genetic characteristics of circulating strains and timely identification of resistant pathogens or strains with increased virulent properties resulting from recombination or being imported [2]. The main advantage of MLST over other molecular and biological typing methods is that data can be integrated in a collection of databases available on the PubMLST.org website [3].

Serological and PCR-based methods can be not efficient enough to characterize the diversity of existing etiological agents for PI, which have to continuously adapt in response to herd immunity. At the same time, the whole-genome analysis makes it possible to obtain comprehensive data on antigenic and genetic characteristics of pathogens; these data, among other things, can be used in developing and improving the existing PCR-based approaches to identification of serotypes. Thus, the **objective** of our study was to provide antigenic and genetic characterization of *S. pneumoniae* strains associated with invasive forms of PI by using the data of high-throughput sequencing.

Materials and Methods

The study was performed on 46 *S. pneumoniae* strains isolated from blood ($n = 10$) and cerebrospinal fluid ($n = 36$) of patients with invasive forms of PI; the strains were isolated during the multicenter studies PE-HASus [8] in 2015–2018. The strains were transported to the central laboratory (the Institute of Antimicrobial Chemotherapy of the Smolensk State Medical University and the Ministry of Health of the Russian Federation) on a Dorset egg medium. The central laboratory conducted species-specific identification of the strains. The strains were cultured on blood agar plates (BioMedia, Russia); their identification by microbiological methods (evaluation of the colony morphology, presence of α -hemolysis, negative catalase test results, the optochin susceptibility test) was confirmed by a latex agglutination test conducted with a Slidex Pneumo-Kit (bioMérieux). For species-specific identification of strains, we also used time-of-flight mass spectrometry using reagents and equipment from Bruker Daltonics. All strains were stored at -70°C , in tubes filled with trypticase soy broth (bioMérieux) with the addition of 30% sterile glycerol (Sigma).

DNAs were isolated by using DNeasy Blood & Tissue Kits (QiaGen). The sequencing was performed at the Department of Molecular Diagnostics and Epidemiology of the Central Research Institute of Epidemiology. The concentration of the obtained DNA samples was measured using Qubit 2.0 fluorometer and Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific); 40 ng of genomic DNA were used for sample preparation. The same preparation was performed using Nextera protocol (Illumina). The indexed whole genome libraries were pooled in equimolar ratios; each set of pooled

libraries was purified and size-selected using Speed-Beads Magnetic Carboxylate Modified Particles (GE Healthcare). The quality of pools was checked with a High Sensitivity DNA Kit (Agilent). High-throughput sequencing performed at HiSeq 1500 instrument using HiSeq PE Rapid Cluster Kit v2 and HiSeq Rapid SBS Kit v2 kits (Illumina).

The SPAdes version 3.13 software (Russia) was used to assemble whole-genome nucleotide sequences [9]. To identify *S. pneumoniae* serotypes SeroBA [10] and PneumoCaT applications were used [11]. Alleles and sequence types were determined in accordance with the MLST scheme for *S. pneumoniae* bacteria [2]. Bioinformatic online resource PubMLST.org was used for the processing of the results of sequencing and MLST analysis [3]. By the completion of the study, the PubMLST database [12] stored the typing results for nearly 48,000 isolates, including more than 14,000 whole-genome sequences of *S. pneumoniae*, 19 of them being received from sequencing of Russian isolates associated mainly with noninvasive forms of PI.

Results

Whole-genome nucleotide sequences were determined for all strains included in this study. The detailed information about the strains and their phenotypic characteristics: serotype, antibiotic susceptibility (for 38 strains) and data about the source (year, region, age, PI form) was entered into the PubMLST database [12]; identification (id) numbers were assigned to the strains: 51080–51125. The PubMLST database also stores the information about the assessment of the quality of the assembly of whole-genome sequences (N50, L50, N90 and other parameters) of the sequenced strains.

The serotype for all studied strains was established through the whole-genome data analysis conducted by using two algorithms [10, 11]. Ten (21%) strains belonged to serotype 3. Five (11%) strains belonged to serotype 19F and 5 strains belonged to serogroup 6; 2 of them belonged to serotype 6A, two (1 and 1) belonged to 6B and 6BE, respectively; and one strain (id-51089) demonstrated the discordant result: 6A or 6BE. Three (6.5%) strains belonged to serotype 15B. Serotypes 7F, 8, 9V, 14, 22F, 23F and 28A were found twice each; serotypes 1, 4, 9N, 10C, 12F, 18C, 35F, 37 and 38 were found once.

Denomination of 7 alleles was completed for all the strains and sequence types were identified [2]. Six sequence types never described previously were identified: ST-15247–15250 (formed by allele combinations unknown before), ST-15251 and ST-15252 (have newly discovered alleles - *aroE*-510 and *xpt*-924, respectively, in the allelic profile).

Discussion

The methods used by Russian researchers until the present time for identification of *S. pneumoniae* serotypes associated with invasive PI were based on

serological tests or PCR or their combination, had limitations and could not provide full-scale characterization of all studied strains or clinical samples containing DNA of encapsulated (cps-positive) isolates. It can be explained by the limited number of antibodies or serotype-specific targets used for diagnostics and by the occurrence of false-negative results. Both factors affected the identification of the entire antigenic diversity of the pathogens that may cause PI. For example, the PCR-based method [7] used for characterization of 89 samples of cerebrospinal fluid from patients with pneumococcal meningitis obtained in Moscow in 2007–2010 made it possible to identify a serotype in 79% of cases; in the same study, the use of additional serotype-specific targets with alternative primers [5, 6] could not increase significantly the proportion of samples with identified serotype. Application of the same method for 235 strains and specimens obtained from patients with pneumococcal meningitis in 2010–2014 in Russia gave almost the same proportion of successfully identified pathogens — 76% [13]. It is approximately 10% greater than the proportion of strains, whose serotype we would have been able to identify in this study: the application of the method [7] would have resulted in the identified serotypes for 31 (67%) strains.

The distribution and relative ratio of the serotypes of circulating pathogens can vary depending on epidemiological patterns which are influenced by the application of polyvalent vaccines. Among strains characterized in this study the proportion of serotypes that are included in PCV13 and PPV23 vaccines was 65% and 80%, respectively. The decrease in the number of cases of invasive PI caused by *S. pneumoniae* serotypes containing in PCV13, which was observed in 2015–2018, could result from the greater vaccination coverage and, most likely, from the fact that pneumococcal vaccine was included in the National vaccination schedule in 2014. At the same time, although PCV13 and PPV23 vaccines contain serotypes 3, 6 and 19F, these serotypes are found more frequently than others among the characterized strains, like during the previous years [1, 13]. The distinctiveness of the studied collection of the samples is also evidenced by the relatively high proportion of strains with serotype 15B and the presence of strains with serotypes 28A, 37 and 38, which previously were not associated with pneumococcal meningitis in Russia.

Taking into account the epidemiological data on strain sources and the information about a vaccination status, the obtained results make it possible to assess efficiency of the existing pneumococcal vaccines in relation to invasive forms of PI and imply the importance of expanding capabilities of the PCR-based methods of serotyping [7] through using additional serotype-specific targets generally aimed at detection of *S. pneumoniae* serotypes 15B, 8, 22F and 12F.

Total 36 sequence types were found in the characterized collection of strains. The MLST-based test

is not able to determine the dominant sequence type or to identify clonal complexes, except for strains of serotype 3, which tend to have a clonal complex combining sequence types ST-180 (5 strains), ST-505 (2 strains) and ST-2049, ST-15250, ST-15251 (each having 1 strain). The comparison of the found sequence types with the sequence types of 108 isolates obtained from patients with pneumococcal meningitis in Russia in previous studies and deposited in PubMLST [12] demonstrated that in both datasets strains with serotype 3 had sequence types ST-180 and ST-505, while the strains of other serotypes had sequence types ST-236, ST-239 and ST-1262; the other sequence types did not match the sequence types found in the previous years. The failure to identify clonal complexes in the studied collection of strains, relatively high occurrence of the newly discovered sequence types (6 out of 36) and the discrepancy between the majority of the detected sequence types and the sequence types found in the studied region in the previous years are consistent with the reported absence of a pronounced clone structure of *S. pneumoniae* associated with pneumococcal meningitis in Russia [1].

Altogether, the results of the whole-genome sequencing provide comprehensive information about antigenic and genetic characteristics of circulating *S. pneumoniae*. Further analysis of the whole-genome data should be focused on the analysis of evolutionary processes and genetic relationships between the characterized strains and strains isolated from other cases of PI, and should be based on the MLST analysis of core genome. The data should be also used for analysis of genetic factors associated with antibiotic resistance and the mechanisms of its development.

REFERENCES

1. Pokrovskiy V.I., Tvorogova M.G., Shipulin G.A., eds. *Molecular Diagnostics of Infectious Diseases [Molekulyarnaya diagnostika infektsionnykh bolezney]*. Moscow: RIPOL klassic; 2018. (in Russian)
2. Enright M.C., Spratt B.G. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology*. 1998; 144 (Pt. 11): 3049-60.
DOI: <http://doi.org/10.1099/00221287-144-11-3049>
3. 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: <http://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>
4. Bentley S.D., Aanensen D.M., Mavroidi A., Saunders D., Rabinowitsch E., Collins M., et al. Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS Genet.* 2006; 2(3): e31.
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020031>
5. Conventional PCR deduction of 40 pneumococcal serotypes or serogroups. Available at: <http://www.cdc.gov/streplab/pcr.html> (Accessed 17.02.2020)
6. Pai R., Gertz R.E., Beall B. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(1): 124-31.
DOI: <http://doi.org/10.1128/JCM.44.1.124-131.2006>

7. Mironov K.O., Platonov A.E., Dunaeva E.A., Kuseva V.I., Shipulin G.A. Real-time PCR procedure for determination of *Streptococcus pneumoniae* serotypes. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2014; 91(1): 41-8. (in Russian)
 8. Ivanchik N.V., Chagaryan A.N., Sukhorukova M.V., Kozlov R.S., Dekhnich A.V., Krechikova O.I., et al. Antimicrobial resistance of clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates in Russia: the results of multicenter epidemiological study «PEHASus 2014–2017». *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2019; 21(3): 230-37.
DOI: <http://doi.org/10.36488/cmasc.2019.3.230-237> (in Russian)
 9. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., et al. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012; 19(5): 455-77.
DOI: <http://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
 10. Epping L., van Tonder A.J., Gladstone R.A., Bentley S.D., Page A.J., Keane J.A. The Global Pneumococcal Sequencing Consortium. SeroBA: rapid high-throughput serotyping of *Streptococcus pneumoniae* from whole genome sequence data. *Microb. Genom.* 2018; 4(7): e000186.
DOI: <http://doi.org/10.1099/mgen.0.000186>
 11. Kapatai G., Sheppard C.L., Al-Shahib A., Litt D.J., Underwood A.P., Harrison T.G., et al. Whole genome sequencing of *Streptococcus pneumoniae*: development, evaluation and verification of targets for serogroup and serotype prediction using an automated pipeline. *PeerJ*. 2016; 4: e2477.
DOI: <http://doi.org/10.7717/peerj.2477>
 12. *Streptococcus pneumoniae* MLST Databases. Available at: <https://pubmlst.org/spneumoniae/> (Accessed 17.02.2020)
 13. Beloshitskiy G.V., Koroleva I.S., Koroleva M.A. Landscape of serotypes pneumococcus isolate with pneumococcal meningitis in the Russian Federation. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika*. 2015; 14(2): 19-25. (in Russian)
- ЛИТЕРАТУРА
1. Покровский В.И., Творогова М.Г., Шипулин Г.А., ред. *Молекулярная диагностика инфекционных болезней*. М.: РИПОЛ классик; 2018.
 2. Enright M.C., Spratt B.G. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology*. 1998; 144 (Pt. 11): 3049-60.
DOI: <http://doi.org/10.1099/00221287-144-11-3049>
 3. 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: <http://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>
 4. Bentley S.D., Aanensen D.M., Mavroidi A., Saunders D., Rabinowitz E., Collins M., et al. Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS Genet.* 2006; 2(3): e31.
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020031>
 5. Conventional PCR deduction of 40 pneumococcal serotypes or serogroups. Available at: <http://www.cdc.gov/streplab/pcr.html> (Accessed 17.02.2020)
 6. Pai R., Gertz R.E., Beall B. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(1): 124-31.
DOI: <http://doi.org/10.1128/JCM.44.1.124-131.2006>
 7. Миронов К.О., Платонов А.Е., Дунаева Е.А., Кусева В.И., Шипулин Г.А. Методика ПЦР в режиме реального времени для определения серотипов *Streptococcus pneumoniae*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2014; 91(1): 41-8.
 8. Иванчик Н.В., Чагарян А.Н., Сухорукова М.В., Козлов Р.С., Дехнич А.В., Кречикова О.И. и др. Антибиотикорезистентность клинических штаммов *Streptococcus pneumoniae* в России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «ПеГАС 2014–2017». *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2019; 21(3): 230-37.
DOI: <http://doi.org/10.36488/cmasc.2019.3.230-237>
 9. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., et al. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012; 19(5): 455-77.
DOI: <http://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
 10. Epping L., van Tonder A.J., Gladstone R.A., Bentley S.D., Page A.J., Keane J.A. The Global Pneumococcal Sequencing Consortium. SeroBA: rapid high-throughput serotyping of *Streptococcus pneumoniae* from whole genome sequence data. *Microb. Genom.* 2018; 4(7): e000186.
DOI: <http://doi.org/10.1099/mgen.0.000186>
 11. Kapatai G., Sheppard C.L., Al-Shahib A., Litt D.J., Underwood A.P., Harrison T.G., et al. Whole genome sequencing of *Streptococcus pneumoniae*: development, evaluation and verification of targets for serogroup and serotype prediction using an automated pipeline. *PeerJ*. 2016; 4: e2477.
DOI: <http://doi.org/10.7717/peerj.2477>
 12. *Streptococcus pneumoniae* MLST Databases. Available at: <https://pubmlst.org/spneumoniae/> (Accessed 17.02.2020)
 13. Белошицкий Г.В., Королева И.С., Королева М.А. Серотиповой пейзаж пневмококков, выделенных при пневмококковом менингите в Российской Федерации. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2015; 14(2): 19-25.

Information about the authors:

Konstantin O. Mironov — Doct. Sci. (Med.), Head, Scientific group of developing new genetic polymorphisms detection methods, Central Research Institute for Epidemiology, 111123, Moscow, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8207-9215>.

E-mail: mironov@pcr.ru

Vitaly I. Korchagin — PhD (Biol.), researcher, Scientific group of developing new genetic polymorphisms detection methods, Central Research Institute for Epidemiology, 111123, Moscow, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2264-6294>

Yuliya V. Mikhailova — PhD (Biol.), Head, Scientific group of novel techniques for molecular analysis, Central Research Institute for Epidemiology, 111123, Moscow, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5646-538X>

Yurii G. Yanushevich — researcher, Scientific group of novel techniques for molecular analysis, Central Research Institute

Информация об авторах:

Миронов Константин Олегович — д.м.н., рук. научной группы разработки новых методов выявления генетических полиморфизмов ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии», 111123, Москва, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8207-9215>.

E-mail: mironov@pcr.ru

Корчагин Виталий Иванович — к.б.н., н.с. научной группы разработки новых методов выявления генетических полиморфизмов ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии», 111123, Москва, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2264-6294>

Михайлова Юлия Владимировна — к.б.н., руководитель научной группы новых технологий молекулярного анализа ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии», 111123, Москва, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5646-538X>

Янушевич Юрий Григорьевич — н.с. научной группы новых технологий молекулярного анализа ФБУН

for Epidemiology, 111123, Moscow, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9061-752X>

Andrey A. Shelonkov — PhD (Phys.-Math.), researcher, Scientific group of novel techniques for molecular analysis, Central Research Institute for Epidemiology, 111123, Moscow, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7409-077X>

Aida N. Chagaryan — PhD (Biol.), researcher, Molecular diagnostics laboratory, Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk State Medical University, 214019, Smolensk, Russia.

ORCID ID: 0000-0001-9195- 8764

Natali V. Ivanchik — PhD (Med.), researcher, Antibiotic resistance laboratory, Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk State Medical University, 214019, Smolensk, Russia.

ORCID ID: 000-0002-9392-0732

Roman S. Kozlov — Doct. Sci. (Med.), Prof., Director, Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk State Medical University, 214019, Smolensk, Russia.

ORCID ID: 0000-0001-8728-1113

Vasily G. Akimkin — Doct. Sci. (Med.), Prof., Academician of the Russian Academy of Sciences, Director, Central Research Institute for Epidemiology, 111123, Moscow, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8139-0247>

Contribution: the authors contributed equally to this article.

«ЦНИИ Эпидемиологии», 111123, Москва, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9061-752X>

Шелонков Андрей Александрович — к.ф.-м.н., н.с. научной группы новых технологий молекулярного анализа ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии», 111123, Москва, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7409-077X>

Чагарян Аида Нуримановна — к.б.н., н.с. лаборатории молекулярной диагностики НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ, 214019, Смоленск, Россия.

ORCID ID: 0000-0001-9195- 8764

Иванчик Натали Владимировна — к.м.н., н.с. лаборатории антибиотикорезистентности НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ, 214019, Смоленск, Россия.

ORCID ID: 000-0002-9392-0732

Козлов Роман Сергеевич — д.м.н., проф., директор НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ, 214019, Смоленск, Россия.

ORCID ID: 0000-0001-8728-1113

Акимкин Василий Геннадьевич — д.м.н., проф., академ. РАН, директор ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии», 111123, Москва, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8139-0247>

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.



Сенсибилизация к аллергенам плесневых грибов у пациентов с респираторной аллергией. Оптимизация диагностического процесса

Христова Д., Кандова Я., Николов Г.✉, Петрунов Б.

Национальный центр инфекционных и паразитарных болезней, 1504, София, Болгария

Актуальность. В Болгарии часто встречается аллергия на плесневые грибы, сенсибилизация к различным аллергенам грибов обнаруживается у многих пациентов с атопией.

Цель данного исследования — установить чувствительность к наиболее распространенным видам плесневых грибов в Болгарии и определить с помощью компонентной диагностики наличие сенсибилизации к Alt a1 — одному из главных аллергенов *Alternaria alternata*.

Материалы и методы. В обследование включен 21 пациент с респираторной аллергией в возрасте 5–40 лет. Сенсибилизация к микстам грибковых аллергенов, содержащих *Alternaria alternata*, *Aspergillus sp.*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium notatum*, у всех пациентов доказана посредством диагностики *in vivo* и *in vitro*. Кроме того, все пациенты тестированы с помощью «ImmunoCAP» на наличие аллергенспецифических IgE к отдельным грибковым аллергенам: m1 *Penicillium notatum*, m2 *Cladosporium herbarum*, m3 *Aspergillus fumigatus* и m6 *Alternaria alternata*. У 10 из обследованных пациентов с повышенным sIgE к m6 *Alternaria alternata* проведена компонентная диагностика с помощью Alt a1.

Результаты. Все обследованные пациенты имели повышенный уровень sIgE к *Alternaria alternata*. Из них 10 (48%) пациентов проявили чувствительность только к *Alternaria alternata*. У 8 (38%) пациентов выявлена сенсибилизация к *Penicillium notatum*, у 11 (52%) — к *Cladosporium herbarum* и у 10 (48%) — к *Aspergillus fumigatus*; 9 (90%) пациентов с сенсибилизацией к *Alternaria alternata* имели повышенный уровень IgE к Alt a1.

Выводы. *Alternaria alternata* чаще других видов плесневых грибов вызывает сенсибилизацию у пациентов с респираторной аллергией в Болгарии. Компонентная алергодиагностика с использованием Alt a1 — главного аллергена плесени — дает полное доказательство видоспецифической сенсибилизации к *Alternaria alternata*.

Ключевые слова: аллергия на плесневые грибы; аллергия на *Alternaria alternata*; компонентная диагностика с помощью Alt a1.

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

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

Для цитирования: Христова Д., Кандова Я., Николов Г., Петрунов Б. Сенсибилизация к аллергенам плесневых грибов у пациентов с респираторной аллергией. Оптимизация диагностического процесса. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2020; 97(2): 119–124.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-119-124>

Поступила 02.03.2020
Принята в печать 20.03.2020

Sensitization to Fungal Allergens in Patients with Respiratory Allergy — Accuracy in Diagnostic Process

Diana Hristova, Yana Kandova, Georgi Nikolov✉, Bogdan Petrunov

National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, 1504, Bulgaria

Introduction. In Bulgaria, mold allergies are common, and sensitization to different fungal species is found in many patients with atopy.

The objective of this study is to explore sensitization to the most widespread mold species in Bulgaria, and to determine the extent of sensitization to Alt a1, a major allergen of *Alternaria alternata*, by using component-resolved diagnosis.

Materials and Methods. 21 patients (14 males and 7 females, age range 5–40 years), with respiratory allergy participated in the study. All patients are sensitized to mix of fungal allergens containing: *Alternaria alternata*, *Aspergillus sp.*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium notatum*, proved by *in vivo* and *in vitro* methods. All patients

underwent the ImmunoCAP test and were assessed for sIgE to individual fungal allergens: m1 *Penicillium notatum*, m2 *Cladosporium herbarum*, m3 *Aspergillus fumigatus* and m6 *Alternaria alternata*. The component-resolved diagnosis to Alt a1 was performed for 10 patients with increased sIgE to m6 *Alternaria alternata*.

Results. All studied patients (100%) had elevated sIgE to *Alternaria alternata*. Eight (38%) patients were sensitized to *Penicillium notatum*. 11 (52%) and 10 (48%) patients were sensitized to *Cladosporium herbarum* and to *Aspergillus fumigatus*, respectively. Ten patients (48%) were monosensitized to *Alternaria alternata*. Nine (90%) patients with sensitization to *Alternaria alternata* demonstrated elevated levels of IgE to Alt a1.

Conclusion. *Alternaria alternata* most often causes sensitization in patients with respiratory allergy. The component-resolved diagnosis using Alt a1 is a precision marker to prove species-specific sensitization to *Alternaria alternata*.

Keywords: mold allergy; allergy to *Alternaria alternata*; Alt a1 component-resolved diagnosis.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

For citation: Hristova D., Kandova Ya., Nikolov G., Petrunov B. Sensitization to fungal allergens in patients with respiratory allergy — accuracy in diagnostic process. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(2): 119–124. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-119-124>

Received 2 March 2020
Accepted 20 March 2020

Введение

Плесневые грибы являются существенным компонентом биоаэрозолей окружающей среды, и многие их аллергены связывают с аллергическими заболеваниями человека, в том числе с аллергическим ринитом, конъюнктивитом, бронхиальной астмой и аллергическим бронхолегочным микозом. В этом плане плесени оказывают более значимое воздействие на иммунную систему пациента, чем пыльца или другие бытовые аллергены [1]. Из-за благоприятных климатических условий аллергия на плесень часто встречается в Болгарии, и сенсibilизация к плесневым грибам обнаруживается у многих пациентов с атопией. Основные виды плесневых грибов, которые чаще всего вызывают сенсibilизацию в стране, — это *Cladosporium*, *Alternaria*, *Penicillium* и *Aspergillus*. Ранее мы показали, что 6% взрослых и детей, тестированных за последние 5 лет в отделе аллергологии, были моносенсibilизированы к плесневым аллергенам [2, 3]. Аллергия на плесень может быть диагностирована при помощи кожно-аллергических проб (прик-тест или интрадермальный тест) с аллергенными экстрактами из плесени или *in vitro* тестами определения в сыворотке крови специфических IgE к плесневым аллергенам. К сожалению, среди плесневых экстрактов аллергенов часто встречается перекрестная реактивность. Это явление уменьшает точность анализа, в связи с чем необходимы ясные алгоритмы прецизионной диагностики аллергии на плесени [4, 5]. Для преодоления ограничений в диагностике на основе натуральных аллергенных экстрактов в последнее время в Европе применяют новый *in vitro* метод молекулярной, или компонентной, диагностики аллергии (CRD), который использует индивидуальные рекомбинантные или нативные аллергенные молекулы. Тесты осуществляются

посредством флюоресцентного иммуноанализа автоматической системой («ImmunoCAP») или на основе мультиплексных микрочиповых методик [6].

Целью данного исследования является изучение сенсibilизации к наиболее распространенным видам плесневых грибов в Болгарии, а также определение посредством CRD степени сенсibilизации к Alt a1 — главному аллергену *Alternaria alternata*.

Материалы и методы

В исследование включен 21 пациент (14 человек мужского пола и 7 — женского, в возрасте 5–40 лет), у которых выявлены симптомы респираторной аллергии. У 7 из них был аллергический ринит, у 9 — бронхиальная астма, а у 5 — бронхиальная астма в сочетании с аллергическим ринитом. У всех пациентов обнаружен положительный кожный тест к групповому фунгальному аллергену Д1 («Vul Bio NCIPD», Болгария), содержащему *Alternaria alternata*, *Aspergillus sp.*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium notatum*. В сыворотке крови у всех пациентов выявлен повышенный уровень аллергенспецифических IgE (sIgE) к миксту плесневых аллергенов Mx1 (класс 2–4), содержащему *Penicillium notatum*, *Cladosporium herbarum*, *Alternaria alternata* и *Aspergillus fumigatus* («Phadia»).

У пациентов, включенных в исследование, определяли с помощью «ImmunoCAP» наличие sIgE к следующим индивидуальным натуральным плесневым аллергенам: m1 *Penicillium notatum*, m2 *Cladosporium herbarum*, m3 *Aspergillus fumigatus* и m6 *Alternaria alternata* («Phadia»). Исследование проводили согласно инструкции производителя, при этом количество специфического sIgE выражали в KUA/L, где уровень выше 0,35 KUA/L считался повышенным.

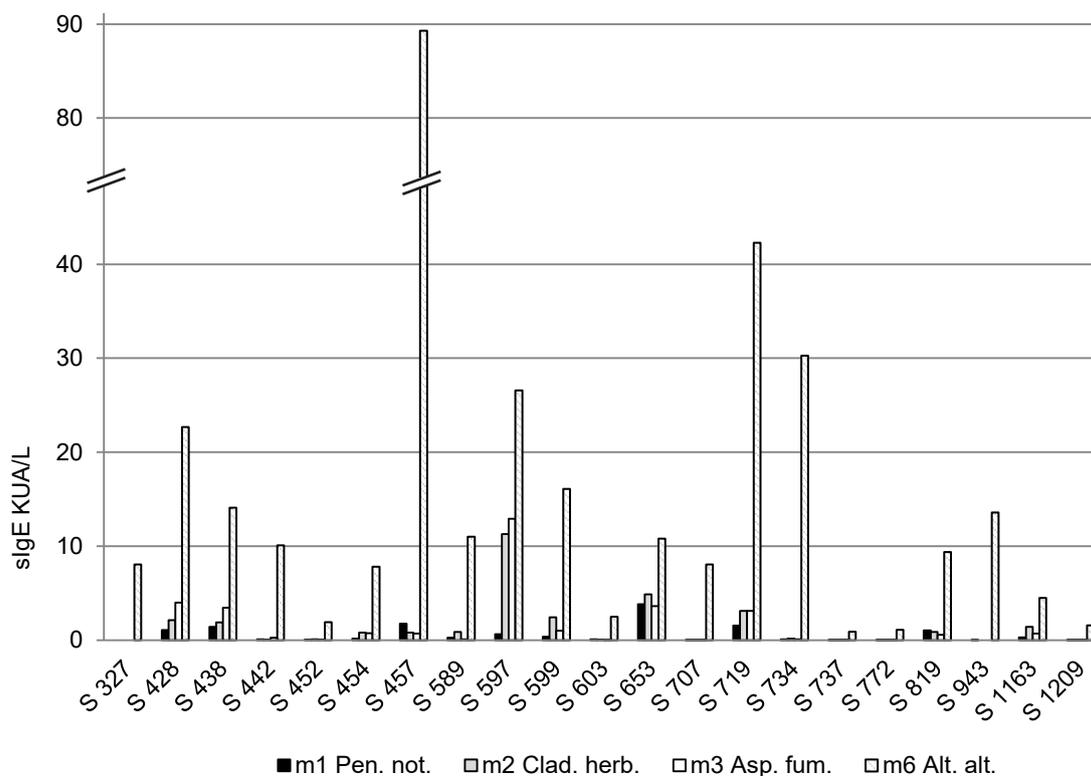


Рис. 1. Определение sIgE к индивидуальным аллергенным экстрактам плесневых грибов.
Fig. 1. Determination of sIgE to individual allergenic mold extracts

В сыворотках 10 пациентов с повышенным sIgE к m6 *Alternaria alternata* (5 — с моносенсибилизацией и 5 — с полисенсибилизацией к другим плесневым аллергенам) посредством «ImmunoCAP» определяли sIgE к m229 Alt a1 («Phadia»).

Результаты обработаны при помощи пакета статистических программ «GraphPad Prism 6.0» («GraphPad Software, Inc.»). Подсчитана средняя величина (*M*) и стандартная ошибка среднего (*SEM*). Тест ранговой корреляции Спирмена использован для выявления связи между двумя количественными показателями — количеством sIgE к m6 *Alternaria alternata* и sIgE к m229 Alt a1. Статистически значимыми приняты значения при $p < 0,05$.

Результаты

Полученные обобщенные уровни sIgE к индивидуальным аллергенным экстрактам исследованных видов плесени представлены на **рис. 1**.

У всех обследованных пациентов выявлен повышенный уровень sIgE к *Alternaria alternata* — в среднем $15,84 \pm 8,52$ KUA/L. Восемь (38%) пациентов оказались сенсибилизированы к *Penicillium notatum* со средним уровнем sIgE $1,46 \pm 0,73$ KUA/L. У 11 (52%) пациентов выявлены также sIgE к *Cladosporium herbarum* и у 10 (48%) — к *Aspergillus fumigatus* в количестве $2,79 \pm 1,83$ и $3,08 \pm 2,31$ KUA/L соответственно.

При анализе данных каждого пациента получены следующие профили сенсибилизации (**таблица**),

Профили сенсибилизации к исследованным плесневым аллергенам у пациентов с респираторной аллергией Sensitization profiles to the studied fungal allergens in patients with respiratory allergy

№	Профили сенсибилизации Sensitization profile				Число пациентов Number of patients	
	Pen. not.	Clad. herb.	Asp. fum.	Alt. alt.	абс. / abs.	%
1	–	–	–	+	10	48
2	+	+	+	+	8	38
3	–	+	+	+	2	9,5
4	–	+	–	+	1	4,5

позволившие разделить пациентов на 2 основные группы:

- 10 (48%) пациентов оказались моносенсibilизированными к *Alternaria alternata*;
- 11 (52%) пациентов были чувствительны к более чем одному виду плесени, при этом 8 (38%) из них имели sIgE к 4 тестируемым плесневым аллергенам.

У 10 пациентов с сенсibilизацией к *Alternaria alternata* была проведена моноконпонентная молекулярная диагностика аллергии на *Alternaria alternata* с использованием рекомбинантного Alt a1 аллергена (rAlt a1). Результаты исследования представлены на рис. 2.

Полученные данные показали, что 9 (90%) пациентов с сенсibilизацией к *Alternaria alternata* имеют повышенный уровень sIgE к rAlt a1. Тест ранговой корреляции Спирмена показал высокую ($r_s = 0,9152$) положительную и статистически значимую корреляцию ($p = 0,0003$) между сывороточным уровнем IgE к m6 *Alternaria alternata* и к rAlt a1 у обследованных пациентов.

Обсуждение

Исследования, проведенные в разных частях мира, показали, что сверхчувствительность к плесени встречается часто, особенно среди индивидов с респираторной аллергией. Точная величина распространения сенсibilизации к плесени неизвестна, цифры варьируют от 3 до 10% общей популяции [7]. Наиболее часто с развитием аллергии связаны 4 рода плесневых грибов: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium* и *Aspergillus* [8]. В результате многих исследований установлено, что *Alternaria alternata* является одним из наиболее важных плесневых грибов, вызывающих аллергию в Европе, и до 70% пациентов показывают положительный кожный тест

на *Alternaria alternata*. Кроме того, доказано, что он является фактором риска развития астмы [7–9]. Наше исследование также показало, что большинство пациентов с аллергией к плесени сенсibilизированы преимущественно к *Alternaria alternata*, и у 48% из них выявлена моносенсibilизация. Остальные 52% пациентов были сенсibilизированы более чем к одному виду плесени, а 38% из них имели sIgE ко всем 4 исследованным плесневым аллергенам. Это еще раз подтверждает наблюдение многих исследователей, что пациенты, чувствительные к плесени, скорее всего, сенсibilизированы к нескольким ее видам [3, 4, 8].

Современная постановка диагноза аллергии на плесневые грибы является поэтапным процессом, который включает сбор анамнеза, кожно-аллергическое тестирование, определение общих и аллергенспецифических IgE в сыворотке крови и, если необходимо, проведение провокационных тестов [10]. Для повышения точности диагноза аллергии на плесень все чаще используют метод молекулярной, или компонентной, алергодиагностики с отдельными рекомбинантными или естественными аллергенными молекулами. Alt a1 — это аллергенная молекула *Alternaria alternata*, которую распознают антитела к IgE у 80–90% пациентов с аллергией на *Alternaria* [11]. Это и определяет Alt a1 как мажорный аллерген, к которому в основном сенсibilизированы пациенты. Поскольку молекула Alt a1 уникальна для данного вида плесневого гриба, сенсibilизация к этому аллергену определяется как видоспецифическая для *Alternaria alternata* [12, 13]. Таким образом, наличие сенсibilизации к Alt a1 можно использовать как маркер точности доказательства аллергии на данный вид плесени [14, 15].

Наши результаты моноконпонентной молекулярной диагностики при помощи rAlt a1 показыва-

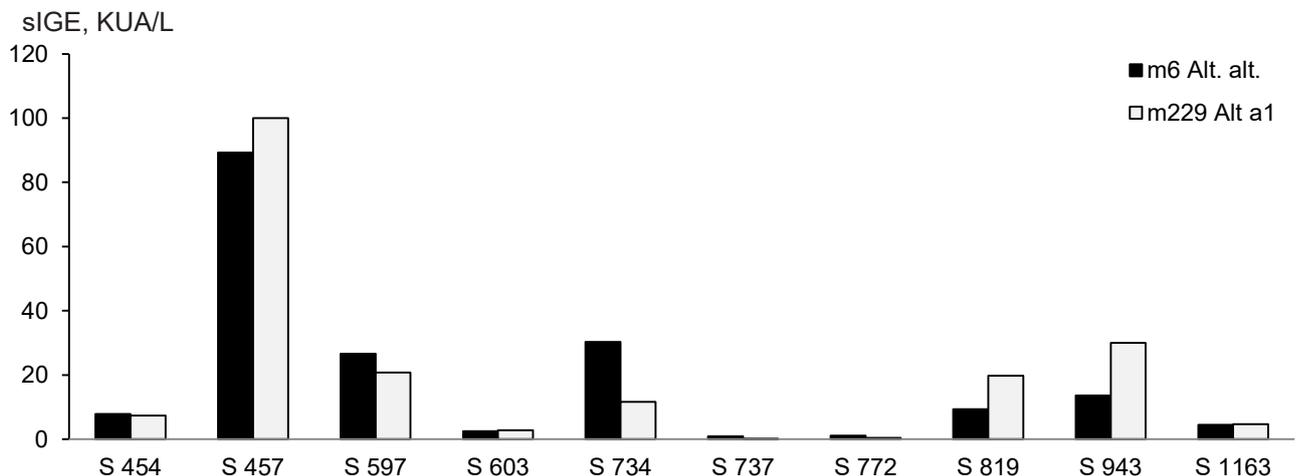


Рис. 2. Сравнение уровней sIgE к натуральному экстракту *Alternaria alternata* (m6) и sIgE к rAlt a1, полученных методом молекулярной диагностики пациентов с респираторной аллергией.

Fig. 2. Comparison of the amounts of sIgE to crude extract of *Alternaria alternata* (m6) and results of CRD with rAlt a1 in patients with respiratory allergy.

ют, что 90% обследованных пациентов с сенсибилизацией к *Alternaria* имеют повышенный уровень IgE к rAlt a1 с высокой положительной ($r_s = 0,9152$; $p = 0,0003$) корреляцией с сывороточным уровнем IgE к *Alternaria*.

Одно из последних исследований, включающее 80 европейских пациентов, показало, что rAlt a1 может быть использован для диагностики 98% пациентов с аллергией на *Alternaria alternata* и что почти все специфические IgE у этих пациентов направлены против Alt a1 [16]. Такое заключение предполагает, что Alt a1 можно использовать в качестве надежного диагностического маркера видоспецифической сенсибилизации к *Alternaria* и он может быть альтернативой натуральному экстракту *Alternaria* в диагностических *in vitro* панелях.

Естественный аллергенный экстракт *Alternaria alternata* содержит и другие аллергенные молекулы, некоторые из которых тоже могут быть идентифицированы как мажорные аллергены [17]. Например, Alt a2 (альдегиддегидрогеназа) — видоспецифический аллерген и Alt a5 (энолаза) — паналлерген, который находится в некоторых фунгальных аллергенных экстрактах [18]. Перекрестная реактивность *Alternaria alternata* с другими видами плесневых грибов, которые распространяются воздушным путем, подробно описана и может быть обусловлена другими аллергенными молекулами [19]. Есть доказательства, что значительная доля пациентов, чувствительных к *Alternaria alternata*, полисенсибилизирована к более чем одному виду плесневых грибов и может также быть сенсибилизирована к другим источникам аэроаллергенов в окружающей среде: пыльце, клещам или даже пищевым аллергенам [8]. По-видимому, наличие такого высокого процента полисенсибилизации к различным видам плесневых грибов у пациентов, включенных в настоящее исследование, может быть вызвано перекрестной реактивностью.

Заключение

Alternaria alternata чаще всего приводит к сенсибилизации у пациентов с респираторной аллергией. Уровень аллергенспецифических IgE к данному виду плесневого гриба наиболее высокий и наблюдается в большом проценте случаев у пациентов с моносенсибилизацией. Молекулярную компонентную диагностику с помощью rAlt a1 можно использовать как маркер для доказательства видовой сенсибилизации к *Alternaria alternata*. Более того, этот рекомбинантный аллерген может быть альтернативой использованию натурального экстракта *Alternaria* в диагностических *in vitro* панелях. Идентификация и характеристика полного спектра аллергенов *Alternaria* и разработка новых методов, основанных на аллергенных рекомбинантных белках, позволит получать более качественные тесто-

вые решения для улучшения диагностики аллергии на *Alternaria alternata* и другие плесневые грибы.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Cramer R., Weichel M., Flückiger S., Glaser A.G., Rhyner C. Fungal allergies: yet unsolved problem. *Chem Immunol. Allergy*. 2006; 91: 121-33.
DOI: <http://doi.org/10.1159/000090276>
2. Nikolov G., Kandova Y., Hristova R., Nedyalkov M., Petrunov B. The role of fungal allergens in respiratory diseases in Bulgaria. In: *Allergy, Asthma & Immunology: From Basic Science to Clinical Application. Proceedings of the V World Asthma and COPD Forum*. New York; 2012: 47-54.
3. Horner W.E., Helbling A., Salvaggio J.E., Lehrer S.B. Fungal Allergens. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; 8(2): 161-79.
4. Bush R.K., Portnoy J.M. The role and abatement of fungal allergens in allergic diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001; 107(3 Suppl.): S430-40.
DOI: <http://doi.org/10.1067/mai.2001.113669>
5. Achatz G., Oberkofler H., Lechenauer E., Simon B., Unger A., Kandler D., et al. Molecular characterization of *Alternaria alternata* and *Cladosporium herbarum* allergens. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1996; 409: 157-61.
DOI: http://doi.org/10.1007/978-1-4615-5855-2_21
6. Shreffler W.G. Microarrayed recombinant allergens for diagnostic testing. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011; 127(4): 843-9.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.02.011>
7. Twaroch T.E., Curin M., Valenta R., Swoboda I. Mold allergens in respiratory allergy: from structure to therapy allergy. *Allergy Asthma Immunol. Res.* 2015; 7(3): 205-20.
DOI: <http://doi.org/10.4168/air.2015.7.3.205>
8. Mari A., Schneider P., Wally V., Breitenbach M., Simon-Nobbe B. Sensitization to fungi: epidemiology, comparative skin tests, and IgE reactivity of fungal extracts. *Clin. Exp. Allergy*. 2003; 33(10): 1429-38.
DOI: <http://doi.org/10.1046/j.1365-2222.2003.01783.x>
9. Asturias J.A., Ibarrola I., Ferrer A., Andreu C., Lopez-Pascual E., Quiralte J., et al. Diagnosis of *Alternaria alternata* sensitization with natural and recombinant Alt a 1 allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005; 115(6): 1210-7.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.02.012>
10. Malling H.J., Dreborg S., Weeke B. Diagnosis and immunotherapy of mould allergy. III. Diagnosis of *Cladosporium* allergy by means of symptom score, bronchial provocation test, skin prick test, RAST, CRIE and histamine release. *Allergy*. 1986; 41(1): 57-67.
DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1986.tb00276.x>
11. Yunginger J.W., Jones R.T., Nesheim M.E., Geller M. Studies on *Alternaria* allergen, III. Isolation of a major allergenic fraction (ALT-I). *J. Allergy Clin. Immunol.* 1980; 66(2): 138-47.
DOI: [http://doi.org/10.1016/0091-6749\(80\)90061-5](http://doi.org/10.1016/0091-6749(80)90061-5)
12. Chruszcz M., Chapman M.D., Osinski T., Solberg R., Demas M., Porebski P.J., et al. *Alternaria alternata* allergen Alt a 1: A unique β -barrel protein dimer found exclusively in fungi. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2012; 130(1): 241-7.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.03.047>
13. Duffort O., Barber D., Polo F. Quantification assay for the major allergen in *Alternaria alternata*, Alt a1. *Alergol. Immunol. Clin.* 2002; 17(3): 162-172.
14. Kustrzeba-Wójcicka I., Siwak E., Terlecki G., Wolańczyk-Mędrała A., Mędrała W. *Alternaria alternata* and its allergens: a comprehensive review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2014; 47(3): 354-65.
DOI: <http://doi.org/10.1007/s12016-014-8447-6>
15. Gabriel M.F., Postigo I., Tomaz C.T., Martinez J. *Alternaria alternata* allergens: Markers of exposure, phylogeny and risk of

- fungi-induced respiratory allergy. *Environ. Int.* 2016; 89-90: 71-80.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.envint.2016.01.003>
16. Twaroch T.E., Focke M., Fleischmann K., Balic N., Lupinek C., Blatt K., et al. Carrier-bound Alt a 1 peptides without allergenic activity for vaccination against *Alternaria alternata* allergy. *Clin. Exp. Allergy.* 2012; 42(6): 966-75.
DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2012.03996.x>
17. Sanchez H., Bush R.K. A review of *Alternaria alternata* sensitivity. *Rev. Iberoam Micol.* 2001; 18(2): 56-9.
18. Simon-Nobbe B., Probst G., Kajava A.V., Oberkofler H., Susani M., Cramer R., et al. IgE-binding epitopes of enolases, a class of highly conserved fungal allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000; 106(5): 887-95.
DOI: <http://doi.org/10.1067/mai.2000.110799>
19. Gupta R., Singh B.P., Sridhara S., Gaur S.N., Kumar R., Chaudhary V.K., et al. Allergenic cross-reactivity of *Curvularia lunata* with other airborne fungal species. *Allergy.* 2002; 57(7): 636-40.
DOI: <http://doi.org/10.1034/j.1398-9995.2002.03331.x>

Информация об авторах:

Христова Диана — Национальный центр инфекционных и паразитарных болезней, 1504, София, Болгария.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9710-1312>

Кандова Яна — доц., Национальный центр инфекционных и паразитарных болезней, 1504, София, Болгария.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2765-7558>

Николов Георгий [✉] — доц., отдел иммунологии, Национальный центр инфекционных и паразитарных болезней, 1504, София, Болгария.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2949-7834>.
E-mail: labalerg@ncipd.org

Петрунов Богдан — Национальный центр инфекционных и паразитарных болезней, 1504, София, Болгария.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8435-6175>

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Information about the authors:

Diana Hristova — National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, 1504, Sofia, Bulgaria.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9710-1312>

Yana Kandova — Assoc. prof., National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, 1504, Sofia, Bulgaria.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2765-7558>

Georgi Nikolov [✉] — Assoc. Prof., Department of immunology, National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, 1504, Sofia, Bulgaria.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2949-7834>.
E-mail: labalerg@ncipd.org

Bogdan Petrunov — National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, 1504, Sofia, Bulgaria.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8435-6175>

Contribution: the authors contributed equally to this article.



Sensitization to Fungal Allergens in Patients with Respiratory Allergy – Accuracy in Diagnostic Process

Diana Hristova., Yana Kandova, Georgi Nikolov[✉], Bogdan Petrunov

National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, 1504, Bulgaria

Introduction. In Bulgaria, mold allergies are common, and sensitization to different fungal species is found in many patients with atopy.

The objective of this study is to explore sensitization to the most widespread mold species in Bulgaria, and to determine the extent of sensitization to Alt a1, a major allergen of *Alternaria alternata*, by using component-resolved diagnosis.

Materials and Methods. 21 patients (14 males and 7 females, age range 5–40 years), with respiratory allergy participated in the study. All patients are sensitized to mix of fungal allergens containing: *Alternaria alternata*, *Aspergillus sp.*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium notatum*, proved by *in vivo* and *in vitro* methods. All patients underwent the ImmunoCAP test and were assessed for sIgE to individual fungal allergens: m1 *Penicillium notatum*, m2 *Cladosporium herbarum*, m3 *Aspergillus fumigatus* and m6 *Alternaria alternata*. The component-resolved diagnosis to Alt a1 was performed for 10 patients with increased sIgE to m6 *Alternaria alternata*.

Results. All studied patients (100%) had elevated sIgE to *Alternaria alternata*. Eight (38%) patients were sensitized to *Penicillium notatum*. 11 (52%) and 10 (48%) patients were sensitized to *Cladosporium herbarum* and to *Aspergillus fumigatus*, respectively. Ten patients (48%) were monosensitized to *Alternaria alternata*. Nine (90%) patients with sensitization to *Alternaria alternata* demonstrated elevated levels of IgE to Alt a1.

Conclusion. *Alternaria alternata* most often causes sensitization in patients with respiratory allergy. The component-resolved diagnosis using Alt a1 is a precision marker to prove species-specific sensitization to *Alternaria alternata*.

Keywords: mold allergy; allergy to *Alternaria alternata*; Alt a1 component-resolved diagnosis.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

For citation: Hristova D., Kandova Ya., Nikolov G., Petrunov B. Sensitization to Fungal Allergens in Patients with Respiratory Allergy – Accuracy in Diagnostic Process. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(2): 119–124. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-119-124>

Received 3 March 2020

Accepted 20 March 2020

Сенсибилизация к аллергенам плесневых грибов у пациентов с респираторной аллергией. Оптимизация диагностического процесса

Христова Д., Кандова Я., Николов Г.[✉], Петрунов Б.

Национальный центр инфекционных и паразитарных болезней, 1504, София, Болгария

Актуальность. В Болгарии часто встречается аллергия на плесневые грибы, сенсибилизация к различным аллергенам грибов обнаруживается у многих пациентов с атопией.

Цель данного исследования — установить чувствительность к наиболее распространенным видам плесневых грибов в Болгарии и определить с помощью компонентной диагностики наличие сенсибилизации к Alt a1 — одному из главных аллергенов *Alternaria alternata*.

Материалы и методы. В обследование включен 21 пациент с респираторной аллергией в возрасте 5–40 лет. Сенсибилизация к микстам грибковых аллергенов, содержащих *Alternaria alternata*, *Aspergillus sp.*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium notatum*, у всех пациентов доказана посредством диагностики *in vivo* и *in vitro*. Кроме того, все пациенты тестированы с помощью «ImmunoCAP» на наличие аллергенспецифических IgE к отдельным грибковым аллергенам: m1 *Penicillium notatum*, m2 *Cladosporium herbarum*, m3 *Aspergillus fumigatus* и m6 *Alternaria alternata*. У 10 из обследованных пациентов с повышенным sIgE к m6 *Alternaria alternata* проведена компонентная диагностика с помощью Alt a1.

Результаты. Все обследованные пациенты имели повышенный уровень sIgE к *Alternaria alternata*. Из них 10 (48%) пациентов проявили чувствительность только к *Alternaria alternata*. У 8 (38%) пациентов выявлена сенсibilизация к *Penicillium notatum*, у 11 (52%) — к *Cladosporium herbarum* и у 10 (48%) — к *Aspergillus fumigatus*; 9 (90%) пациентов с сенсibilизацией к *Alternaria alternata* имели повышенный уровень IgE к Alt a1.

Выводы. *Alternaria alternata* чаще других видов плесневых грибов вызывает сенсibilизацию у пациентов с респираторной аллергией в Болгарии. Компонентная аллергодиагностика с использованием Alt a1 — главного аллергена плесени — дает полное доказательство видоспецифической сенсibilизации к *Alternaria alternata*.

Ключевые слова: аллергия на плесневые грибы; аллергия на *Alternaria alternata*; компонентная диагностика с помощью Alt a1.

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

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

Для цитирования: Христова Д., Кандова Я., Николов Г., Петрунов Б. Сенсibilизация к аллергенам плесневых грибов у пациентов с респираторной аллергией. Оптимизация диагностического процесса. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2020; 97(2): 119–124.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-119-124>

Поступила 02.03.2020

Принята в печать 20.03.2020

Introduction

Fungi are major components of environmental bioaerosols; many mold allergens have been associated with allergic diseases in humans, including allergic rhinitis, conjunctivitis, bronchial asthma and allergic broncho-pulmonary mycoses. Thus, molds have a far greater impact on people's immune system than pollen or other allergenic sources [1].

In Bulgaria, due to favorable climatic conditions, mold allergy is common, and sensitization is found in many patients with atopy. The main mold species, which most often cause sensitization in our country, are: *Cladosporium*, *Alternaria*, *Penicillium* and *Aspergillus*. Our previous findings show that at least 6 % of the adults and children evaluated in our department over the last 5 years are mono-sensitized to fungal allergens [2, 3].

Sensitization to fungi can be detected through skin prick and intradermal tests with fungal extracts or in vitro tests for specific IgE antibodies. Unfortunately, cross-reactivity among molds is a commonly observed phenomenon. It reduces the accuracy of the mold allergy diagnosis; therefore, clear algorithms for accurate diagnostic process are required [4–5].

To overcome limitations typical of standard allergy diagnostics relying on crude allergen extracts, European allergists have turned to molecular or component-resolved diagnostics (CRD) using individual recombinant or native allergenic molecules tested on a fluorescence enzyme immunoassay (ImmunoCAP) or a microarray-based assay platform [6].

The objective of this study is to explore sensitization to the mold species most common in Bulgaria, and to determine the extent of sensitization to Alt a 1 – the major allergen from *Alternaria alternata* using CRD.

Materials and methods

21 patients (14 males and 7 females, age range 5–40 years) participated in the study. All patients suffered from clinically manifested respiratory allergy. Seven of them had allergic rhinitis, 9 patients had bronchial asthma and 5 – bronchial asthma and allergic rhinitis.

All patients had a positive allergy skin test to EI Mixed fungal allergen (Bul Bio NCIPD) containing: *Alternaria alternata*, *Aspergillus sp.*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium notatum*.

All patients had elevated allergen-specific IgE (sIgE) – class 2–4 when tested *in vitro* by ImmunoCAP with mx1 Mold mix (Phadia) containing *Penicillium notatum*, *Cladosporium herbarum*, *Alternaria alternata* and *Aspergillus fumigatus*.

The patients participating in the study were tested using ImmunoCAP for sIgE to the following individual fungal allergens: m1 *Penicillium notatum*, m2 *Cladosporium herbarum*, m3 *Aspergillus fumigatus* and m6 *Alternaria alternata* (Phadia). The study was performed according to the manufacturer's instructions. The amount of allergen-specific sIgE was calculated in KUA/l. The levels above 0.35 KUA/l were considered as elevated.

10 patients with elevated sIgE to m6 *Alternaria alternata* (5 with monosensitization and 5 with polysensitization to the other studied mold allergens) were evaluated for sIgE to m229 Alt a 1 using ImmunoCAP according to the manufacturer's instructions. The amount of sIgE was calculated in KUA/l, with levels above 0.35 KUA/l being considered as elevated.

The results were statistically processed by using the GraphPad Prism 6.0 software package (GraphPad Software, Inc.). The mean (M) and standard error of

the mean (SEM) were calculated. Spearman's rank-order correlation test was used to measure the strength and direction of the association between two ranked variables – sIgE to m6 *Alternaria alternata* and sIgE to m229 Alt a 1. P values of <0.05 were considered statistically significant.

Results

Summarized results for the sIgE levels to individual allergen extracts from the studied mold species are shown in Fig. 1.

All 21 patients (100%) had elevated IgE to *Alternaria alternata*, with the measured amount averaging 15.84 ± 8.52 KUA/l. Eight (38%) patients were sensitized to *Penicillium notatum* with an amount of sIgE of 1.46 ± 0.73 KUA/l. 11 (52%) patients were sensitized to *Cladosporium herbarum*, and 10 (48%) patients were sensitized to *Aspergillus fumigatus*, with amounts of IgE 2.79 ± 1.83 and 3.08 ± 2.31 KUA/l, respectively.

Based on the analysis of the data for every patient we identified the following profiles of sensitization (Table).

According to the results, two main groups of sensitization were identified. Ten (48%) patients were monosensitized to *Alternaria alternata*. The other 11 patients (52%) were sensitized to more than one fungal species and 8 (38%) patients had sIgE to all four tested mold allergens.

Mono-component resolved diagnosis using a recombinant Alt a 1 allergen (rAlt a 1) was performed for 10 patients with sensitization to *Alternaria alternata* (5 with monosensitization and 5 with polysensitization). The results of the study are shown in Fig. 2.

The data show that 90% (n=9) of the studied patients with sensitization to *Alternaria alt.* had elevated levels of IgE to rAlt a 1. The Spearman's rank-order correlation test showed a high ($r_s = 0.9152$), positive and statistically significant ($p = 0.0003$) correlation between serum levels of IgE to *Alternaria* and those to rAlt a 1 in the studied patients.

Discussion

Surveys conducted in various parts of the world demonstrated that sensitization to fungi is common, particularly in patients with respiratory allergy. The exact prevalence of mold sensitization is not known but is estimated to range from 3% to 10% in the general population [7]. The 4 genera most commonly associated with the development of mold allergy are: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium*, and *Aspergillus* [8].

Many studies proved that *Alternaria alternata* is one of the most important allergenic molds in Europe, and up to 70% of mold-allergic patients show positive skin test to *Alternaria alternata*; it is known to be a risk factor for development of asthma [7-9].

Our study also demonstrated that most of the patients with mold allergy were sensitized primary to *Al-*

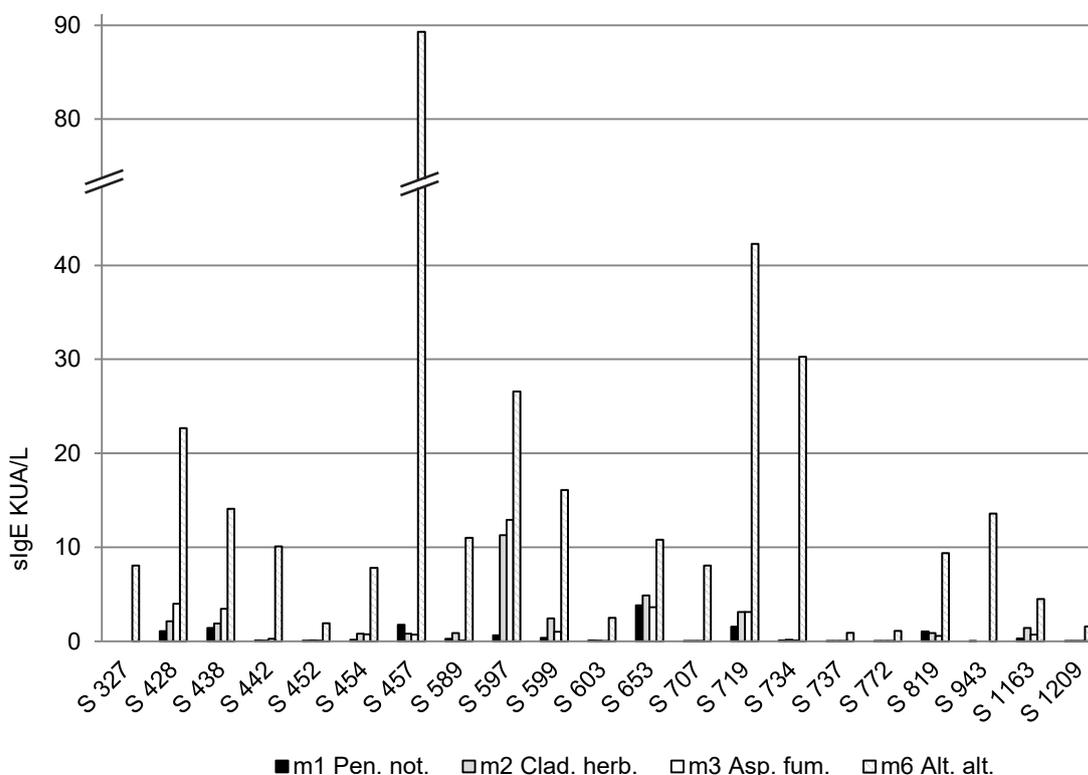


Fig. 1. Determination of sIgE to individual allergenic mold extracts

Sensitization profiles to the studied fungal allergens in patients with respiratory allergy

No.	Sensitization profile				Number of patients	
	Pen. not.	Clad. herb.	Asp. fum.	Alt. alt.	abs.	%
1	–	–	–	+	10	48
2	+	+	+	+	8	38
3	–	+	+	+	2	9,5
4	–	+	–	+	1	4,5

ternaria alternate, and 48% of patients had monosensitization to *Alternaria alternata*. The other 52% of patients were sensitized to more than one fungal species and 38% of patients had sIgE to all four tested mold allergens. These findings confirm the observation of many researchers that patients allergic to moulds are usually sensitised to several species [3, 4, 8].

Diagnosis of mold allergy, as routinely performed today, is a stepwise process, including anamnesis, determination of total and allergen-specific IgE antibodies, skin tests and, if necessary, other provocation tests [10].

To improve the accuracy of contemporary diagnosis of mold allergy, allergists use CRD with individual recombinant or native allergenic molecules more and more frequently.

Alt a 1 is an allergen molecule that is recognized by IgE antibodies in 80–90% of *Alternaria* allergic individuals [11]. Thus, Alt a 1 can be seen as a major allergen of *Alternaria alternata*, to which patients are primarily sensitized. As the Alt a 1 molecule is specific only to this fungal species, sensitization to this allergen is defined as species-specific for *Alternaria alternata* [12–13]. Thus, the existing sensitization to Alt a 1 can be used as a precision marker to prove allergy to this fungal species [14–15].

Our results from mono-component resolved diagnosis using a rAlt a 1 show that 90% of the studied patients with sensitization to *Alternaria* have elevated

levels of IgE to rAlt a 1, and there is a high ($r_s = 0.9152$), positive and statistically significant ($p = 0.0003$) correlation between serum levels of IgE to *Alternaria* and those to rAlt a 1.

Recently, the study including 80 European patients showed that rAlt a 1 can be used to diagnose 98% of patients with allergy to *Alternaria alternata* and that almost all specific IgE in these patients were directed against Alt a 1 [16].

This finding suggests that Alt a 1 can be used as a reliable diagnostic marker allergen for genuine sensitisation to *Alternaria* and could be alternative to the *Alternaria* extract in diagnostic panels *in vitro*.

The natural allergenic extract of *Alternaria alternata* also contains other allergenic molecules, some of which can also be identified as major allergens [17]. These are, for example, Alt a 2 (aldehyde dehydrogenase), a species-specific allergen, and Alt a 5 (enolase) – panallergen, which is found in a number of fungal allergenic extracts [18].

The cross-reactivity of *A. alternata* with other airborne fungal species has been extensively described [19] and there is evidence that a significantly high percentage of patients sensitized to *A. alternata* are poly-sensitized to more than one other fungal species and might also be sensitized to other environmental aeroallergen sources such as pollens, mites or even to food allergens [8]. Therefore, it can be assumed that the presence of such a high percentage of patients poly-sensi-

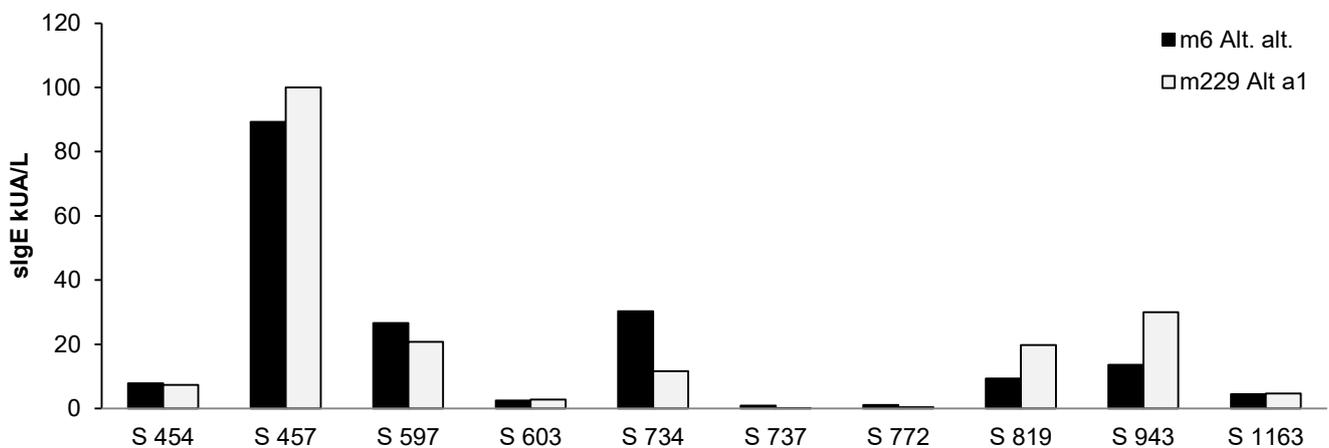


Fig. 2. Comparison of the amounts of sIgE to crude extract of *Alternaria alternata* (m6) and results of CRD with rAlt a 1 in patients with respiratory allergy.

tized to different mold species in the present study can be explained by cross-reactivity.

Conclusion

Alternaria alternata most often causes sensitization in patients with respiratory allergy. The levels of allergen-specific IgE to this fungal species are the highest. Moreover, this fungal species is the most common cause of the monosensitization.

The component-resolved diagnosis using rAlt a 1 can be used as a precision marker to prove species-specific sensitization to *Alternaria alternata* and could be alternative to the use of *Alternaria* extract in diagnostic panels *in vitro*.

The identification and characterization of the whole array of *Alternaria* allergens and new techniques based on allergenic recombinant proteins will contribute to preparation of higher quality test solutions to improve *Alternaria* allergy diagnosis.

REFERENCES

1. Cramer R., Weichel M., Flückiger S., Glaser A.G., Rhyner C. Fungal allergies: yet unsolved problem. *Chem Immunol. Allergy*. 2006; 91: 121-33.
DOI: <http://doi.org/10.1159/000090276>
2. Nikolov G., Kandova Y., Hristova R., Nedyalkov M., Petrunov B. The role of fungal allergens in respiratory diseases in Bulgaria. In: *Allergy, Asthma & Immunology: From Basic Science to Clinical Application. Proceedings of the V World Asthma and COPD Forum*. New York; 2012: 47-54.
3. Horner W.E., Helbling A., Salvaggio J.E., Lehrer S.B. Fungal Allergens. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; 8(2): 161-79.
4. Bush R.K., Portnoy J.M. The role and abatement of fungal allergens in allergic diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001; 107(3 Suppl.): S430-40.
DOI: <http://doi.org/10.1067/mai.2001.113669>
5. Achatz G., Oberkofler H., Lechenauer E., Simon B., Unger A., Kandler D., et al. Molecular characterization of *Alternaria alternata* and *Cladosporium herbarum* allergens. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1996; 409: 157-61.
DOI: http://doi.org/10.1007/978-1-4615-5855-2_21
6. Shreffler W.G. Microarrayed recombinant allergens for diagnostic testing. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011; 127(4): 843-9.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.02.011>
7. Twaroch T.E., Curin M., Valenta R., Swoboda I. Mold allergens in respiratory allergy: from structure to therapy allergy. *Allergy Asthma Immunol. Res.* 2015; 7(3): 205-20.
DOI: <http://doi.org/10.4168/aaair.2015.7.3.205>
8. Mari A., Schneider P., Wally V., Breitenbach M., Simon-Nobbe B. Sensitization to fungi: epidemiology, comparative skin tests, and IgE reactivity of fungal extracts. *Clin. Exp. Allergy*. 2003; 33(10): 1429-38.
DOI: <http://doi.org/10.1046/j.1365-2222.2003.01783.x>
9. Asturias J.A., Ibarrola I., Ferrer A., Andreu C., Lopez-Pascual E., Quiralte J., et al. Diagnosis of *Alternaria alternata* sensitization with natural and recombinant Alt a 1 allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005; 115(6): 1210-7.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.02.012>
10. Malling H.J., Dreborg S., Weeke B. Diagnosis and immunotherapy of mould allergy. III. Isolation of a major allergenic fraction (ALT-I). *J. Allergy Clin. Immunol.* 1980; 66(2): 138-47.
DOI: [http://doi.org/10.1016/0091-6749\(80\)90061-5](http://doi.org/10.1016/0091-6749(80)90061-5)
11. Chruszcz M., Chapman M.D., Osinski T., Solberg R., Demas M., Porebski P.J., et al. *Alternaria alternata* allergen Alt a 1: A unique β -barrel protein dimer found exclusively in fungi. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2012; 130(1): 241-7.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.03.047>
12. Duffort O., Barber D., Polo F. Quantification assay for the major allergen in *Alternaria alternata*, Alt a 1. *Alergol. Immunol. Clin.* 2002; 17(3): 162-172.
13. Kustrzeba-Wójcicka I., Siwak E., Terlecki G., Wolańczyk-Mędrała A., Mędrała W. *Alternaria alternata* and its allergens: a comprehensive review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2014; 47(3): 354-65.
DOI: <http://doi.org/10.1007/s12016-014-8447-6>
14. Gabriel M.F., Postigo I., Tomaz C.T., Martínez J. *Alternaria alternata* allergens: Markers of exposure, phylogeny and risk of fungi-induced respiratory allergy. *Environ. Int.* 2016; 89-90: 71-80.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.envint.2016.01.003>
15. Twaroch T.E., Focke M., Fleischmann K., Balic N., Lupinek C., Blatt K., et al. Carrier-bound Alt a 1 peptides without allergenic activity for vaccination against *Alternaria alternata* allergy. *Clin. Exp. Allergy*. 2012; 42(6): 966-75.
DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2012.03996.x>
16. Sanchez H., Bush R.K. A review of *Alternaria alternata* sensitivity. *Rev. Iberoam Micol.* 2001; 18(2): 56-9.
17. Simon-Nobbe B., Probst G., Kajava A.V., Oberkofler H., Susani M., Cramer R., et al. IgE-binding epitopes of enolases, a class of highly conserved fungal allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000; 106(5): 887-95.
DOI: <http://doi.org/10.1067/mai.2000.110799>
18. Gupta R., Singh B.P., Sridhara S., Gaur S.N., Kumar R., Chaudhary V.K., et al. Allergenic cross-reactivity of *Curvularia lunata* with other airborne fungal species. *Allergy*. 2002; 57(7): 636-40.
DOI: <http://doi.org/10.1034/j.1398-9995.2002.03331.x>

Информация об авторах:

Христова Диана — Национальный центр инфекционных и паразитарных болезней, 1504, София, Болгария.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9710-1312>

Кандова Яна — доц., Национальный центр инфекционных и паразитарных болезней, 1504, София, Болгария.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2765-7558>

Николов Георгий[✉] — доц., отдел иммунологии, Национальный центр инфекционных и паразитарных болезней, 1504, София, Болгария.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2949-7834>.
E-mail: labalerg@ncicpd.org

Information about the authors:

Diana Hristova — National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, 1504, Sofia, Bulgaria.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9710-1312>

Yana Kandova — Assoc. Prof. (Immunology and allergy), National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, 1504, Sofia, Bulgaria.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2765-7558>

Georgi Nikolov[✉] — Assoc. Prof., Department of immunology, National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, 1504, Sofia, Bulgaria.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2949-7834>.
E-mail: labalerg@ncicpd.org

Bogdan Petrunov — National Centre of Infectious and Parasitic

Петрунов Богдан — Национальный центр инфекционных и паразитарных болезней, 1504, София, Болгария.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8435-6175>

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Diseases, 1504, Sofia, Bulgaria.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8435-6175>

Contribution: the authors contributed equally to this article.



Характеристика связывания вакцинных штаммов вируса *Varicella zoster* с препаратами мембранных рецепторов мозга мышей

Нагиева Ф.Г.[✉], Баркова Е.П., Строева А.Д., Сидоров А.В., Лотте В.Д., Зверев В.В.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 115088, Москва, Россия

Цель работы — охарактеризовать вакцинные штаммы vFiraVax (возбудитель ветряной оспы — VZV) и vZelVax (возбудитель опоясывающего герпеса — HZ) по их способности к связыванию с препаратами мембранных рецепторов мозга SPF мышей линии BALB/c.

Материалы и методы. В работе использовали разработанные авторами на основе дикого родительского вируса rFira VZV (возбудитель ветряной оспы) и латентного родительского вируса lpZe HZ (возбудитель опоясывающего герпеса) холодоадаптированные вакцинные вирусные штаммы vFiraVax VZV и vZelVax HZ; вакцинные штаммы vOka, выделенные из вакцин для профилактики VZV-инфекции двух производителей (Великобритания, США); штамм диплоидных клеток легких эмбриона человека ЛЭЧ-3; штамм диплоидных клеток кожно-мышечной ткани эмбриона человека КМ 27; первичные и диплоидные клетки фибробластов эмбрионов морских свинок.

Инфекционную активность VZV определяли методом предельных разведений вируса на клеточных культурах КМ 27 или фибробластов эмбрионов морских свинок. Титр вируса устанавливали по реакции гемадсорбции со взвесью эритроцитов морской свинки или человека «0» группы, резус плюс. Для исследования вирусного препарата в электронном микроскопе использовали метод негативного контрастирования. Иммуногенность вирусных штаммов vFiraVax VZV и vZelVax HZ сравнивали с иммуногенностью вирусных штаммов vOka VZV разных производителей в перекрестной реакции нейтрализации иммунных сывороток.

Результаты. Отечественные холодоадаптированные вакцинные штаммы vFiraVax VZV и vZelVax HZ, родительский латентный вирус lpZe HZ и вакцинный штамм vOka VZV (Великобритания) не связывались с препаратами нейрорецепторов мозга SPF мышей линии BALB/c в отличие от дикого родительского варианта rFira VZV и вакцинных штаммов vOka VZV (США); отсутствие нейротропности отечественных вакцинных штаммов vFiraVax VZV и vZelVax HZ не связано со снижением иммуногенности по отношению к зарубежным аналогам; в концентрате вирусосодержащей жидкости vFiraVax VZV при электронно-микроскопическом исследовании обнаружены нуклеокапсиды VZV.

Выводы. Существуют различия в способности VZV к связыванию с препаратами мембранных рецепторов мозга SPF мышей линии BALB/c, обусловленные различиями в технологиях создания вакцин, в том числе способами аттенуации, получения вакцинного штамма, особенностями родительского латентного вируса lpZe HZ. Доказано отсутствие связывания с препаратами нейрорецепторов мозга SPF мышей линии BALB/c отечественных вакцинных штаммов vFiraVax VZV и vZelVax HZ, не связанное со снижением их иммуногенности. Метод оценки связывающей способности вакцинных штаммов VZV может быть применен в качестве предварительной характеристики нейротропности вновь создаваемых вакцинных штаммов и вакцинных препаратов.

Ключевые слова: вирус ветряной оспы и опоясывающего герпеса; дикий родительский вирус; латентный родительский вирус; холодоадаптированный вакцинный вирусный штамм; аттенуированные вакцинные вирусные штаммы; препарат мембранного рецептора мозга мышей; инфекционность образца; нейротропность.

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

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

Для цитирования: Нагиева Ф.Г., Баркова Е.П., Строева А.Д., Сидоров А.В., Лотте В.Д., Зверев В.В. Характеристика связывания вакцинных штаммов вируса *Varicella zoster* с препаратами мембранных рецепторов мозга мышей. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2020; 97(2): 125–133.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-125-133>

Поступила 27.01.2020
Принята в печать 20.02.2020

Characterization of Binding of *Varicella Zoster* Virus Vaccine Strains to Preparations of Mouse Brain Membrane Receptors

Firaya G. Nagieva[✉], Elena P. Barkova, Alexandra D. Stroevea, Alexandr V. Sidorov, Vera D. Lotte, Vitaly V. Zverev

I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, 115088, Moscow, Russia

Purpose: characterization of vFiraVax (the causative agent of chickenpox — VZV) and vZelVax (the causative agent of shingles — HZ) vaccine strains by their ability to bind to preparations of brain membrane receptors of SPF BALB/c mice.

Materials and Methods. The study was performed on cold-adapted vFiraVax VZV and vZelVax HZ vaccine strains developed by the authors on the basis of the wild-type parental pFira VZV virus (chickenpox causative agent) and the latent parental lpZel HZ virus (shingles causative agent); vOka vaccine strains isolated from vaccines against VZV infection from two manufactures (United Kingdom and USA); the HEL-3 strain of diploid cells from human embryonic lung tissue, the MC 27 strain of diploid cells from human embryonic musculocutaneous tissue, primary and diploid cells from guinea pig fetal fibroblasts. The VZV infectivity was estimated by the limiting dilution method using MC 27 cell cultures or guinea pig fetal fibroblasts. The virus titer was measured by the hemadsorption test performed with suspensions of red blood cells from guinea pig or human type 0 positive blood. Negative staining and electron microscopy were used to study the virus preparation. The immunogenicity of vFiraVax VZV and vZelVax HZ virus strains was compared with the immunogenicity of vOka VZV virus strains from different manufacturers by using a cross-neutralization test with immune sera.

Results. The Russian cold-adapted vFiraVax VZV and vZelVax HZ vaccine strains, the latent parental lpZel HZ virus and the vOka VZV vaccine strain (United Kingdom) did not bind to preparations of brain neuroreceptors of SPF BALB/c mice as distinct from the wild-type parental pFira VZV variant and vOka VZV vaccine strains (USA); the absent neurotropism of Russian vFiraVax VZV and vZelVax HZ vaccine strains is not connected with the decreased immunogenicity in relation to foreign counterparts; the electron microscope study of the vFiraVax VZV virus containing liquid concentrate detected VZV nucleocapsids.

Conclusion. The differences in the VZV ability to bind to preparations of brain membrane receptors of SPF BALB/c mice can be explained by the differences in the technology of vaccine manufacturing, including attenuation techniques, obtaining of the vaccine strain, specific characteristics of the latent parental lpZel HZ virus. The absence of the binding with brain neuroreceptors of SPF mice has been proved for the Russian vFiraVax VZV and vZelVax HZ vaccine strains which was is not connected with a decrease in their immunogenicity. The method of assessment of the binding ability of VZV vaccine strains can be used as a preliminary characteristic of neurotropism for newly created vaccine strains and for vaccine products.

Keywords: *varicella-zoster virus; wild-type parental virus; latent parental virus; cold-adapted vaccine strain; attenuated vaccine strains; preparation of mouse brain membrane receptors; infectivity of the sample; neurotropism.*

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

For citation: Nagieva F.G., Barkova E.P., Stroeva A.D., Sidorov A.V., Lotte V.D., Zverev V.V. Characterization of binding of *Varicella Zoster* virus vaccine strains to preparations of mouse brain membrane receptors. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(2): 125–133. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-125-133>

Received 27 January 2020

Accepted 20 February 2020

Введение

Вирус ветряной оспы (VZV) является высоко клеточносвязанным нейротропным α -герпесвирусом человека и возбудителем ветряной оспы и опоясывающего герпеса (HZ). После первичной инфекции VZV устанавливает продолжительную латентную инфекцию в чувствительных ганглиях периферической нервной системы и реактивируется позднее с индукцией неврологических расстройств. Первичные и рецидивирующие инфекции VZV более тяжелы у пациентов с ослабленным иммунитетом, поскольку исход заболевания зависит от эффективного клеточноопосредованного иммунного ответа. Реактивация VZV из латентности в чувствительных нервных ганглиях является прямым следствием его нейротропности [1–3].

Для изучения нейротропности, латентности и реактивации VZV разработано несколько моделей *in vivo* [4, 5]. Несмотря на информативность, эти модели *in vivo* не подходят для механистических исследований. Более того, они недоступны широкому научному сообществу, потому что технически сложны, дороги и не позволяют получить одобрение этических комиссий для некоторых из этих экспериментов в определенных странах [6].

Особую озабоченность у специалистов вызывает нейротропность вакцинных штаммов VZV. Существует полемика вокруг вакцинного штамма vOka VZV в отношении его способности защищать от реактивации характерной для него нейровирулентности [7].

Как правило, нейротропность вакцинных штаммов вирусов для живых культуральных вакцин исследуют заражением в мозг обезьян макака резус (*Macaca mulatta*), чувствительных к VZV.

В работе [8] предложен способ аттенуации вирусов в зависимости от их способности связываться или не связываться с мембранными рецепторами мозга (МРМ) человека, обезьян или грызунов. Авторы основывались на данных о том, что вирус не может заражать восприимчивую клетку, если его вирусный белок прикрепления не соединяется на клеточной поверхности с молекулой, служащей в качестве рецептора для данного вируса. Суть способа аттенуации вирусов авторы заключают в отборе кандидатов в живые вирусные вакцины путем селекции вирусных вариантов, которые не связываются с препаратами МРМ. Задачей авторов являлось выделение из общей смеси диких вирусов и препаратов МРМ человека, обезьяны или грызуна

нов вирусных вариантов, которые не связываются с препаратами МРМ, т.е. авторы предложили новый способ получения ослабленных вирусов.

Мы решили воспользоваться предложенным способом для характеристики связывающей способности в отношении препаратов нейрорецепторов мозга мышей уже аттенуированных классическим способом вакцинных штаммов VZV.

Нами получены 2 холодоадаптированных (ХА) штамма VZV: vFiraVax VZV и vZelVax HZ [9, 10]. Клинический изолят для аттенуации vFiraVax VZV выделен от здорового ребенка 6 лет, а для vZelVax HZ — от мужчины 63 лет в период реактивации опоясывающего герпеса. Для обоих ХА-вирусных штаммов подробно изучены биологическая активность в различных клеточных культурах, биологические маркеры аттенуации, а также иммуногенность *in vivo* в организме морских свинок. Отличием методики получения вакцинных препаратов являются особенности аттенуации штаммов при низких температурах и создание вакцины из внеклеточных вирусосодержащих материалов.

Целью работы являлась оценка способности к связыванию с препаратами МРМ SPF мышей линии BALB/c отечественных ХА-штаммов VZV и их зарубежных аналогов.

Материалы и методы

В работе использовали штамм диплоидных клеток легкого эмбриона человека (ЛЭЧ-3), штамм диплоидных клеток кожно-мышечной ткани эмбриона человека (КМ 27), первичную культуру клеток фибробластов эмбриона морской свинки (пкФЭМС) и штамм диплоидных клеток фибробластов эмбриона морской свинки (дкФЭМС). Клеточные культуры выращивали на питательной среде DMEM/F12 («PanEco») с 10 мМ НЕРЕS, 5% эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС; «HyClone») с добавлением 2 мМ L-глутамин и 40 мкг/мл гентамицина.

Изучаемые вирусы:

- дикий вирусный родительский вариант pFira VZV — pFira VZV;
- ХА-вакцинный штамм vFiraVax VZV — vFiraVax VZV;
- латентный родительский вариант lpZel HZ — lpZel HZ;
- ХА-вакцинный вирусный штамм vZelVax HZ — vZelVax HZ;
- вакцинный вирусный штамм vOka VZV, выделенный из вакцины для профилактики VZV (США) — vOka VZV (USA);
- вакцинный вирусный штамм vOka VZV, выделенный из вакцины для профилактики VZV (Великобритания) — vOka VZV (UK).

Аттенуацию диких вирусных вариантов — pFira VZV и lpZel HZ — проводили классическим способом путем пассирования клинических изоля-

тов при пониженной температуре (30°C) в клеточных культурах: ЛЭЧ-3 — 12 пассажей, пкФЭМС — 6 пассажей, ЛЭЧ-3 — еще 2 пассажа. Продолжительность одного пассажа составляла 10 сут.

Инфекционную активность VZV определяли на клеточной культуре КМ 27 или дкФЭМС, выращенных на 24-луночных планшетах. Посевная концентрация клеток составляла 10^5 клеток на лунку. Готовили десятикратные разведения вирусосодержащей жидкости (ВСЖ) с 10^{-1} до 10^{-10} и по 0,1 мл ВСЖ вносили в лунки планшета с клеточной тест-культурой. Контакт ВСЖ с клеточным монослоем продолжался 1,0–1,5 ч при 36,5°C. По завершении контакта во все лунки, включая контрольные неинфицированные клетки, вносили по 0,9 мл поддерживающей среды — DMEM с 2% ЭТС. Результаты титрования вируса учитывали на 7-е сутки с момента инфицирования в реакции гемадсорбции с 0,25% взвесью эритроцитов морской свинки или эритроцитов человека «0» группы, резус плюс. За титр вируса принимали максимальное разведение вируса, вызывающее гемадсорбцию в 50% инфицированных культур, при отсутствии гемадсорбции в контрольных неинфицированных культурах клеток.

Готовили 0,25% взвесь эритроцитов морской свинки или человека путем трехкратного отмывания эритроцитов 0,9% NaCl. По 0,3 мл взвеси эритроцитов вносили в лунки планшета с инфицированными и неинфицированными контрольными клетками, предварительно отмытыми фосфатно-солевым буфером (ФСБ). Клетки с эритроцитами выдерживали 30 мин при 4°C и дополнительно 30 мин при комнатной температуре. Затем лунки планшета трехкратно отмывали от эритроцитов 0,9% NaCl и регистрировали наличие или отсутствие гемадсорбции в световом микроскопе ($\times 70$).

Морские свинки массой 300–400 г были иммунизированы подкожно одной прививочной дозой вакцинными штаммами: vFiraVax VZV, vZelVax HZ, vOka VZV (USA). Кардиальная пункция была сделана на 37-е и 80-е сутки с момента иммунизации. Полученные иммунные сыворотки были обработаны препаратом RDE 11 («Seiken») для удаления термоллабильных и термостабильных ингибиторов серологических реакций.

Перекрестная реакция нейтрализации поставлена на клеточной культуре КМ 27, выращенной на 24-луночных планшетах («Costar») в ростовой среде DMEM/F12 с 5% ЭТС, с 2 мМ глутамин и 40 мкг/мл гентамицина. Приготовили 10 разведений иммунной вирусспецифической сыворотки с двукратным шагом, начиная с 1 : 50. В каждое разведение иммунной сыворотки в объеме 0,2 мл добавляли 0,2 мл 1000 доз вируса (1 прививочная доза в 0,1 мл), смесь вортексировали и оставляли на контакте на 1 ч при 37°C, периодически вортексируя каждые 15 мин. После удаления ростовой среды из 24-лу-

ночных планшетов с выросшими клетками в каждые 2 лунки одного разведения вносили по 0,1 мл смеси и оставляли на контакте на 1 ч в инкубаторе при 37°C и 5% CO₂. После завершения контакта в каждую лунку вносили по 0,8 мл поддерживающей среды DMEM с 2% ЭТС и культивирование продолжали в течение 7 сут. На каждом планшете ставили контроль дозы вируса и контроль клеток.

Клеточную культуру дкФЭМС выращивали в 3 культуральных флаконах площадью 175 см². После формирования сплошного монослоя клеток ростовую среду из флаконов удаляли, клеточный монослой дважды отмывали ФСБ, содержащим ионы Ca²⁺ и Mg²⁺, и на клеточный монослой вносили по 5 мл клеточной суспензии ЛЭЧ-3, инфицированной vFiraVax VZV. Контакт инфицированных клеток на клеточном монослое продолжался 2 ч при 30°C. После завершения контакта в инфицированные культуральные флаконы вносили по 35 мл поддерживающей питательной среды DMEM без сыворотки и культивирование при 30°C продолжали в течение 14 сут. Затем культуральные флаконы с инфицированными клетками трижды замораживали при -70°C с последующим оттаиванием. Инфицированную клеточную суспензию в объеме 100 см³ центрифугировали при 4000 об/мин («Gouan») в течение 15 мин при 4°C. Полученный надосажок переносили в центрифужные пробирки для ультрацентрифугирования на центрифуге «Optima», ротор SW 32 Ti при 25 000 об/мин в течение 3 ч. Собранный в трис-буфере осадок после определения инфекционности передали для электронной микроскопии.

Электронная микроскопия. Для исследования препаратов в электронном микроскопе был использован метод негативного контрастирования. В соответствии с указанным методом производилась неизбирательная адсорбция содержащихся во взвеси структур на электронно-микроскопическую сеточку, покрытую формваровой пленкой, стабилизированной углеродом. Для увеличения содержания на пленке вирусспецифических структур был применен один из методов иммуноэлектронной микроскопии. Согласно этому методу адсорбцию материала осуществляли на формварово-углеродную пленку, предварительно сенсibilизированную иммунной сывороткой к VZV. Все препараты фиксировали 4% параформальдегидом pH 7,0, промывали ФСБ и контрастировали 1% раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты pH 7,0.

Препараты исследовали в электронном микроскопе «GEM-100 CX» при инструментальном увеличении 58 000 и фотографировали на пленку «AQFA».

Выделение тотальной ДНК. Вирусную ДНК из образцов выделяли стандартным методом фенол-хлороформной экстракции [8] с некоторыми модификациями, а именно: образцы после осаждения спиртом были дополнительно очищены от при-

месей с помощью микродиализа с использованием фильтров «Centrifugal Filter Units» Ultra 0,5 ml 3K membrane («Millipore»). Очистка проводилась 5 раз с добавлением 480 мкл Tris 10 mM к 20 мкл образца с последующим центрифугированием.

Неспецифическую амплификацию ДНК для увеличения содержания в образцах вирусной ДНК проводили с помощью набора реактивов Ready-To-Go GenomiPhi V3 DNA Amplification Kit, используя протокол производителя.

ПЦР в реальном времени проводили по методике [11]. Реакционную смесь для ПЦР готовили непосредственно перед ПЦР (на 1 реакцию необходимо: 10 мкл 2,5x буфера с Taq-полимеразой, 1 мкл TaqMan зонда VZV 29 концентрацией 10 мкМ, 2 мкл прямого и обратного праймеров концентрацией 5 мкМ, 7 мкл воды). ПЦР проводили на приборе DT Prime 95 («ДНК-технология») по следующему протоколу: исходное плавление при 95°C 120 с, затем 45 циклов при 95°C 15 с и 55°C 60 с. Результаты реакций учитывали по пороговому циклу, используя программное обеспечение производителя прибора.

Клонирование и определение нуклеотидных последовательностей (секвенирование) вирусной ДНК. Образцы ДНК использовали в качестве матриц для амплификации фрагмента геномной вирусной ДНК, кодирующего открытые рамки считывания 0 и 1, длиной 815 пар нуклеотидных остатков, для чего были сконструированы праймеры CGC CAGCCTTTAACA AAAAC (прямой) и TATTTTGG GATCCGCAATG (обратный). ПЦР проводили на термоциклере «TProfessional Gradient» («Biometra») с использованием высокоточной полимеразы Phusion, следуя рекомендациям производителя.

Продукты ПЦР обрабатывали однократно Taq-полимеразой (для получения 3'-А-концов), затем вставляли в pAL2-T вектор («Евроген») с помощью T4 ДНК-лигазы с последующей трансформацией в штамм *E. coli* XL1-Blue и отбором клонов путем селекции с антибиотиком ампициллином, а также бело-голубой селекции с использованием хромогенного субстрата X-Gal.

Из отдельных клонов выделяли плазмидную ДНК, которую анализировали методом электрофореза в агарозных гелях в присутствии этидиума бромида, затем определяли нуклеотидные последовательности вставок. Синтез праймеров и секвенирование заказывали в фирмах «Евроген» и «Синтол».

Для конструирования праймеров и зондов, определения стратегии клонирования, а также анализа нуклеотидных последовательностей использовали пакет программ «Vector NTI».

Получение МРМ мышей. Иссекали мозги у 15–20 голов 4-недельных SPF мышей линии BALB/c, определяли вес (4,7–6,3 г), добавляли 50 mM трис-буфера pH 7,6 и гомогенизировали в гомогенизаторе Даунса. Гомогенат центрифугировали

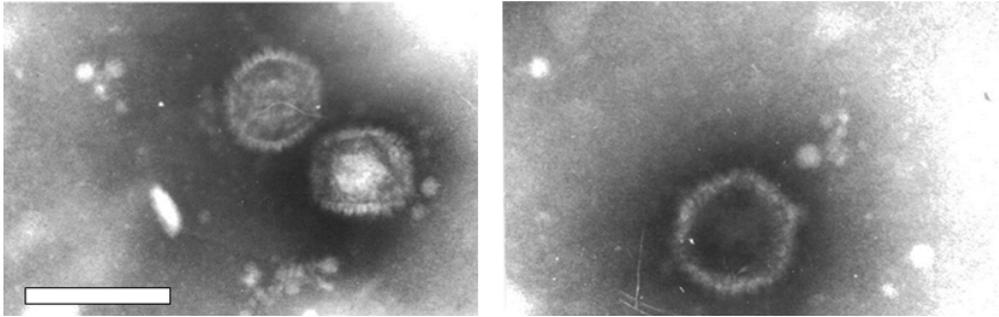


Рис. 1. Данные электронной микроскопии (×150 000), масштабная линейка соответствует 100 нм.
Fig. 1. Electronic microscopy (×150,000), the large-scale ruler corresponds to 100 nm.

при 14 000 об/мин в течение 15 мин при 4°C в настольной центрифуге. Соотношение вес : объем — 1 : 7. Надосадоk декантировали, в осадок добавляли аналогичный объем буфера и этот процесс повторяли дважды. Между 2-м и 3-м центрифугированием гомогенат инкубировали при 37°C в течение 10 мин. Конечный осадок ресуспендировали в питательной среде DMEM с 2% ЭТС и влажный мозг хранили при -70°C до использования. Концентрацию белка в мозговой смеси определяли на спектрофотометре «NanoPhotometer NP 89-Touch». Концентрация белка в конечном осадке должна быть в пределах 20–40 мг/мл. В экспериментах использовали 38–40 мг/мл препарата MPM SPF мышей линии BALB/c.

Определение остаточной инфекционной активности после связывания вируса с нейрорецепторами мозга мышей. К 100 мкл ВСЖ штаммов pFira VZV (2-й пассаж), vFiraVax VZV (20-й пассаж), IpZel HZ (2-й пассаж), vZelVax HZ (20-й пассаж), vOka (USA), vOka (UK) добавляли по 900 мкл нейрорецепторов мозга SPF мышей линии BALB/c. К 100 мкл ВСЖ вышеперечисленных вариантов VZV добавляли по 900 мкл трис-буфера. Контроль: к 100 мкл трис-буфера добавляли 900 мкл нейрорецепторов мозга мышей. Все вышеперечисленные образцы инкубировали при 37°C в течение 30 мин с периодическим встряхиванием каждые 5 мин. Затем все образцы центрифугировали при 14 000 об/мин в течение 15 мин для удаления мембранного материала и связанного с ним вируса.

Определяли остаточную вирусную инфекционность образцов в супернатанте путем титрования методом предельных разведений на чувствительных к VZV клеточных культурах дкФЭМС. Инфекционность оценивали по реакции гемадсорбции с 0,25% взвесью эритроцитов морских свинок.

Анализ результатов проводили с использованием статистического пакета «Prism — GraphPad».

Результаты

Для получения подтверждения наличия VZV в исследуемом материале был проведен анализ концентрата ВСЖ штамма vFiraVax VZV в электронном

микроскопе. В препарате методом негативного контрастирования обнаружены только нуклеокапсиды ХА-штамма vFiraVax VZV на 20-м пассажном уровне (**рис. 1**). Вирионы внеклеточной ВСЖ VZV пока по невыясненной причине при электронной микроскопии не выявляются [12].

Идентичность вируса также подтверждали с помощью частичного секвенирования выделенных плазмидных фрагментов ДНК рамки *orf 0* штаммов pFira VZV и IpZel HZ на 8-м пассаже. Участок генома

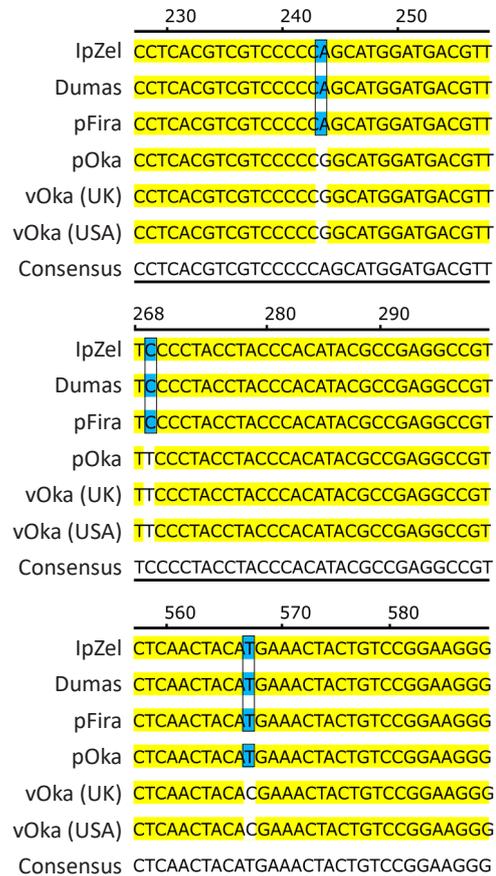
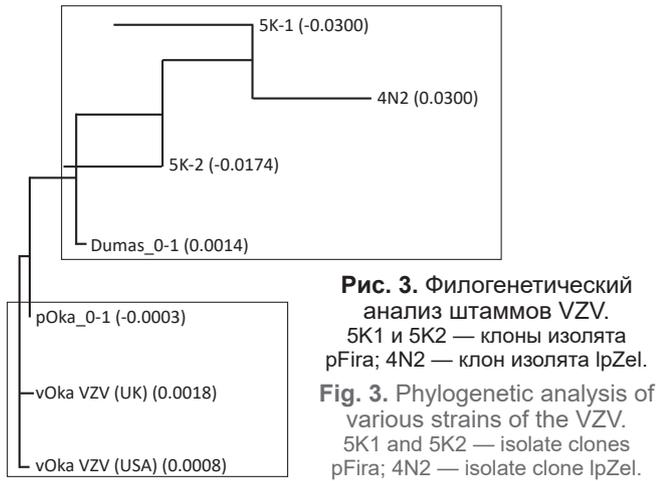


Рис. 2. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей вирусной ДНК штаммов VZV. Dumas — европейский дикий VZV.

Fig. 2. Comparative analysis (alignment) of the nucleotide sequences of the viral DNA of strains of VZV. Dumas — European wild VZV.



в размере 580 нуклеотидных последовательностей ДНК частично аттенуированных при пониженной температуре вирусных вариантов VZV сравнивали с европейским вирусным штаммом Dumas и с японскими штаммами pOka VZV и vOka VZV (рис. 2).

Предварительный филогенетический анализ показал, что частично аттенуированные варианты pFira VZV и lpZel HZ, используемые для создания отечественных ХА-вакцинных штаммов, являются ближайшими соседями штамма Dumas, что соответствует европейскому типу VZV, и несколько отличаются от японского генотипа (рис. 3).

Мутация в позиции 567 (T567C, Stop-Arg) (рис. 2) является одной из молекулярных детерминант ослабления вируса в вакцинных штаммах по сравнению с дикими. Сравнительный анализ вирусных нуклеотидных последовательностей показал, что штаммы pFira и lpZel на ранних пассажах являются частично аттенуированными и не содержат

мутации, характерной для аттенуированных вакцинных штаммов [13–15].

Самым важным свойством живых аттенуированных вакцин является их более высокая эффективность по сравнению с инактивированными вакцинами, поскольку они способны вызывать более сильные врожденный и адаптивный гуморальный и клеточный иммунные ответы.

Иммунная сыворотка к ХА-вирусному штамму vFiraVax VZV, полученная на 37-е и 80-е сутки с момента иммунизации морских свинок, одинаково высоко нейтрализовала все 3 штамма VZV (рис. 4): наибольшая нейтрализующая активность отмечена с гомологичным штаммом и наименьшая — с вирусным вакцинным штаммом vOka VZV (USA). Иммунная сыворотка к вакцинному штамму vOka VZV (USA), полученная на 37-е сутки с момента иммунизации морских свинок, одинаково нейтрализовала все 3 штамма VZV, включая гомологичный вакцинный штамм vOka VZV (USA).

Несколько отличалась нейтрализующая активность иммунной сыворотки к штамму vOka VZV (USA), полученной на 80-е сутки с момента иммунизации. В высоком титре она нейтрализовала все 3 исследованных штамма VZV. Результаты, полученные в перекрестной реакции нейтрализации, четко продемонстрировали, что отечественные ХА-штаммы vFiraVax VZV и vZelVax HZ по иммуногенности *in vivo* на морских свинках не уступали штамму vOka VZV (USA).

Специфичность связывания VZV с нейрорецепторами мозга SPF мышей линии BALB/c определяли с помощью сравнения вирусов дикого типа и аттенуированных вакцинных вирусных штаммов [16]. При сравнении ХА-штамма vFiraVax VZV на 20-м пасса-

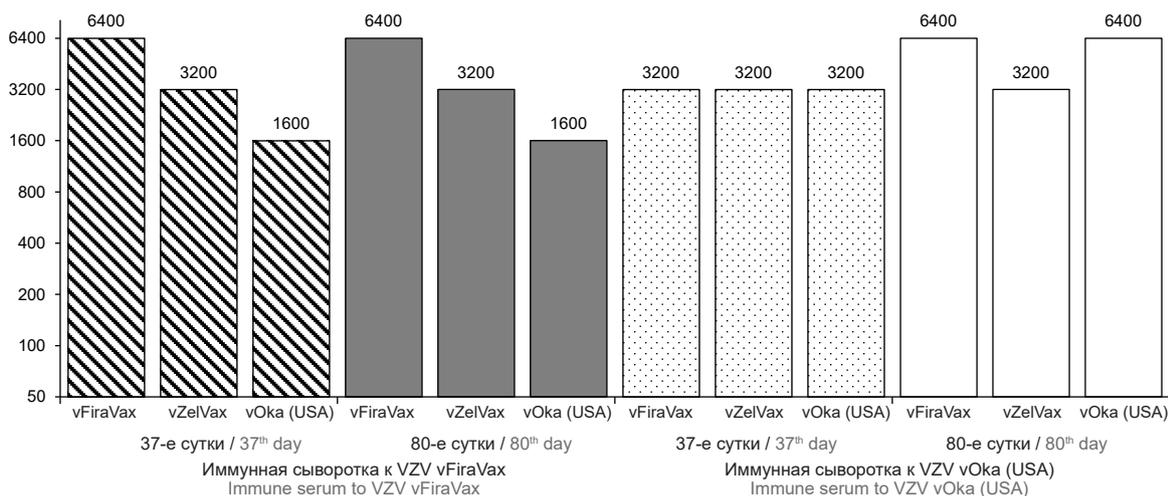


Рис. 4. Перекрестная реакция нейтрализации аттенуированных штаммов VZV (1000 доз) с иммунными сыворотками морских свинок, полученными на 37-е и 80-е сутки после иммунизации.

По оси ординат — нейтрализующие титры иммунных сывороток со 100% защитой.

Fig. 4. Cross-reaction of neutralization of attenuated strains of VZV (1000 doses) with immune sera of guinea pigs on the 37th and 80th days from the moment of immunization.
 Ordinate: Neutralization titers of immune sera: 100% protection.

же с его диким родительским вариантом на 2-м пассаже выявлено, что дикий вирусный вариант pFira VZV связывается с препаратом нейрорецепторов мозга SPF мышей линии BALB/c с индексом связывания 2,0 lg ГАДЕ_{50/0,1 мл} (таблица), процент связывания составляет 25,03, в то время как vFiraVax VZV полностью утратил тропизм к нервной ткани.

Иная картина наблюдается с латентным родительским вирусом опоясывающего герпеса lpZel HZ, который находился более 50 лет в чувствительных нервных ганглиях пациента 63 лет, постоянно реактивируясь и вызывая постгерпетическую невралгию. Этот латентный родительский вирус lpZel HZ и его ХА-вакцинный вирусный штамм vZelVax HZ утратили тропизм к нервной ткани мозга SPF мышей линии BALB/c.

Обращает на себя внимание наличие связывания вакцинного штамма vOka VZV (USA) с препаратами нейрорецепторов мозга SPF мышей линии BALB/c. Индекс связывания составляет 1,0 lg ГАДЕ_{50/0,1 мл}, процент связывания — 15,4. Однако вирусный штамм vOka VZV (UK) утратил тропизм к нейрорецепторам мозга SPF мышей линии BALB/c. Различная связывающая способность по отношению к нейрорецепторам мозга мышей одного и того же японского вакцинного вирусного штамма vOka VZV, на наш взгляд, объясняется различной историей пассажей в клеточных культурах у разных производителей.

Таким образом, используя относительно простой метод оценки связывающей способности вакцинных штаммов VZV к нейрорецепторам мозга SPF мышей линии BALB/c, можно получить предварительную характеристику нейротропности новых вакцинных штаммов.

В данных экспериментах четко продемонстрировано, что созданные нами отечественные ХА-штаммы vFiraVax VZV и vZelVax HZ не связываются с нейрорецепторами мозга грызунов, в отличие от диких родительских вариантов.

Обсуждение

Современные вакцины против ветряной оспы, являясь существенно ослабленными, могут сохранять остаточную нейровирулентность и повреждать сенсорные ганглии. Факторы, участвующие в инвазии нейронов и установлении латентности, не ясны [7].

Изучение нейротропности VZV с использованием животных моделей является проблемой, поскольку вирус вызывает заболевания только у людей и обезьян макака резус (*Macaca mulatta*) [17]. Эти исследования сложны и дороги [18–20].

Целью исследования явилась характеристика вакцинных вирусных штаммов *Varicella zoster* — vFiraVax VZV и vZelVax HZ по их способности связываться с препаратами мембранных рецепторов мозга SPF мышей линии BALB/c.

До постановки основного эксперимента по оценке связывающей способности вакцинных штаммов VZV с нейрорецепторами мозга SPF мышей линии BALB/c мы определили по данным электронной микроскопии наличие нуклеокапсидов в концентрате ВСЖ вакцинного штамма — vFiraVax VZV и подтвердили по результатам частичного секвенирования выделенных плазмидных ДНК фрагментов рамки *orf 0* их аналогичность европейским штаммам VZV.

Далее мы сравнили основную и самую важную функцию вакцинных штаммов — иммуногенность *in vivo*. С этой целью была поставлена перекрестная реакция нейтрализации вакцинных штаммов vFiraVax VZV и vZelVax HZ в сравнении с зарубежным vOka VZV (USA) с сыворотками морских свинок, иммунизированных подкожно одной прививочной дозой. Иммуногенность всех исследованных штаммов была высокой, и отечественные вакцинные штаммы по иммуногенности не уступали зарубежному вакцинному штамму vOka VZV (USA).

В наших экспериментах дикий родительский вариант pFira VZV связывался с препаратом МРМ мышей в отличие от ХА-вакцинного штамма

Сравнительная оценка связывания штаммов VZV с препаратами МРМ SPF мышей линии BALB/c Comparative assessment of the binding of VZV strains to BMR preparations SPF BALB/c mice

Вирусный штамм Viral strain	Инфекционность, lg ГАДЕ _{50/0,1 мл} Infectivity, lg HAU _{50/0.1 ml}		p	Индекс связывания, lg ГАДЕ _{50/0,1 мл} The binding index, lg HAU _{50/0.1 ml}	Связывание, % Binding, %
	вирус + буфер (n = 4) virus + buffer (n = 4)	вирус + МРМ (n = 4) virus + BMR (n = 4)			
vFiraVax VZV	7,5 ± 0,029	8,5 ± 0,036	<0,001	-1,0	0
pFira VZV	8,5 ± 0,051	6,5 ± 0,035	<0,001	2,0	25,03
vZelVax HZ	7,5 ± 0,041	7,5 ± 0,029	>0,05	0	0
lpZel HZ	8,0 ± 0,041	8,5 ± 0,046	<0,05	-0,5	0
vOka VZV (UK)	7,0 ± 0,034	7,5 ± 0,029	<0,05	-0,5	0
vOka VZV (USA)	6,5 ± 0,005	5,5 ± 0,055	<0,001	1,0	15,4

Примечание. ГАДЕ — гемадсорбирующая единица.
 Note. BMR — brain membrane receptors; HAU — hemoadsorbition unit.

vFiraVax VZV. Однако латентный родительский вариант lpZel HZ и ХА-вакцинный штамм vZelVax HZ не связывались с препаратами МРМ мышей. Промонстрирована различная связывающая способность вакцинного штамма vOka VZV, полученного из вакцин разных производителей: так вакцинный штамм vOka VZV (UK) не связывался с МРМ мозга мышей, а индекс связывания для вакцинного штамма vOkaVZV (USA) был равен 1 Ig ГАДЕ 50/0,1 мл.

Показанные отличия, на наш взгляд, связаны с различной технологией создания вакцин на основе вакцинного штамма vOka VZV (внутриклеточного вируса, связанного с клеточным материалом), использованием внеклеточного вирусосодержащего материала зарубежными и отечественными разработчиками, различными способами аттенуации [9] и получения вакцинного штамма, особенностями родительского вируса lpZel HZ, обусловленными длительным пребыванием латентного вируса в нервных ганглиях человека. В результате исследований было подтверждено отсутствие связывающей способности вакцинных штаммов VZV с нейрорецепторами мозга мышей отечественных вакцинных штаммов при иммуногенности, сопоставимой с зарубежными аналогами, а также возможность использования предложенного метода для предварительной оценки нейротропности VZV вновь создаваемых вакцинных штаммов и вакцинных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zerboni L., Reichett M., Arvin A. Varicella zoster virus neurotropism in SCID mouse-human dorsal root ganglia xenografts. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 2010; 342: 255-76. DOI: http://doi.org/10.1007/82_2009_8
2. Reiss C.S. *Neurotropic Viral Infections. Volume 562.* Cambridge: Cambridge University Press; 2008. DOI: <http://doi.org/10.1017/CBO9780511541728>
3. Mahalingam R., Gershon A., Gershon M., Cohen J.I., Arvin A., Zerboni L., et al. Current *in vivo* models of Varicella zoster virus neurotropism. *Viruses.* 2019; 11(6): 502-27. DOI: <http://doi.org/10.3390/v11060502>
4. Cohen J.I. Rodent models of varicella zoster virus neurotropism. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2010; 342: 277-89. DOI: http://doi.org/10.1007/82_2010_11
5. Depledge D.P., Sadaoka T., Ouwendijk W.D. Molecular aspects of varicella zoster virus latency. *Viruses.* 2018; 10(7): 349-70. DOI: <http://doi.org/10.3390/v10070349>
6. Baird N.L., Zhu S., Pearce C.M., Borbolla A.V. Current *in vitro* models to study varicella zoster virus latency and reactivation. *Viruses.* 2009; 11(2): 103-18. DOI: <http://doi.org/10.3390/v11020103>
7. Selariu A., Cheng T., Tang Q., Silver B., Yang L., Liu C., et al. ORF7 of Varicella zoster virus is a neurotropic factor. *J. Virol.* 2012; 86(16): 8614-24. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.00128-12>
8. Sinzger C., Knapp J., Schmidt K., Kahl M., Jahn G. A simple and rapid method for preparation of viral DNA from cell associated cytomegalovirus. *J. Virol. Methods.* 1999; 81(1-2): 115-22. DOI: [http://doi.org/10.1016/s0166-0934\(99\)00058-0](http://doi.org/10.1016/s0166-0934(99)00058-0)
9. Осокина О.В., Баркова Е.П., Нагиева Ф.Г., Зверев В.В. Штамм «vFiraVax» для получения аттенуированной живой

культуральной вакцины для профилактики ветряной оспы. Патент РФ № 2693440; 2019.

10. Баркова Е.П., Зверев В.В., Нагиева Ф.Г., Осокина О.В. Способ получения живой культуральной аттенуированной вакцины для профилактики ветряной оспы. Патент РФ № 2637093; 2017.
11. Фам Х.Ф., Сидоров А.В., Милованова А.В., Антонова Т.П., Лисаков А.Н., Нагиева Ф.Г. и др. Новый подход к диагностике Varicella zoster – вирусной инфекции с использованием ПЦР в режиме реального времени. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2016; 15(5): 52-8. DOI: <http://doi.org/10.31631/2073-3046-2016-15-5-52-58>
12. Cohen J.I., Straus S.E., Arvin A.M., eds. Varicella zoster virus replication, pathogenesis and management. In: Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Fields Virology.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007: 24-32.
13. Depledge D.P., Kundu S., Jensen N.J., Gray E.R., Jones M., Steinberg S., et al. Deep sequencing of viral genomes provides insight into the evolution and pathogenesis of varicella zoster virus and its vaccine in humans. *Mol. Biol. Evol.* 2014; 31(2): 397-409. DOI: <http://doi.org/10.1093/molbev/mst210>
14. Peters G.A., Tyler S.D., Carpenter J.E., Jackson W., Mori Y., Arvin A.M., et al. The attenuated genotype of varicella zoster virus includes an ORF0 transitional stop codon mutation. *J. Virol.* 2012; 86(19): 10695-703. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.01067-12>
15. Depledge D.P., Yamanishi K., Gomi Y., Gershon A.A., Breuer J. Deep sequencing of distinct preparations of the live attenuated varicella zoster virus vaccine reveals a conserved core of attenuating single-nucleotide polymorphisms. *J. Virol.* 2016; 90(19): 8698-704. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.00998-16>
16. Barrett A., Ryman K., Ni H. Method of attenuating viruses. Patent US EP0922092B1; 1999.
17. Sorel O., Messaoudi I. Varicella virus – host interactions during latency and reactivation: lessons from simian varicella virus. *Front. Microbiol.* 2018; 9: 3170-9. DOI: <http://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03170>
18. Baird N.L., Zhu S., Pearce C.M., Viejo-Borbolla A. Current *in vitro* models to study varicella zoster virus latency and reactivation. *Viruses.* 2019; 11(2): 103-18. DOI: <http://doi.org/10.3390/v11020103>
19. Gershon M., Gershon A. Varicella zoster virus and the enteric nervous system. *J. Infect. Dis.* 2018; 218(Suppl. 2): 113-9. DOI: <http://doi.org/10.1093/infdis/jiy407>
20. Takahashi M., Hayakawa Y., Shiraki K., Yamanishi K., Asano Y., Ozaki T. Attenuation and laboratory markers of the Okazaki strain varicella zoster virus. *Postgrad. Med. J.* 1985; 61(Suppl. 4): 37-46.

REFERENCES

1. Zerboni L., Reichett M., Arvin A. Varicella zoster virus neurotropism in SCID mouse-human dorsal root ganglia xenografts. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 2010; 342: 255-76. DOI: http://doi.org/10.1007/82_2009_8
2. Reiss C.S. *Neurotropic Viral Infections. Volume 562.* Cambridge: Cambridge University Press; 2008. DOI: <http://doi.org/10.1017/CBO9780511541728>
3. Mahalingam R., Gershon A., Gershon M., Cohen J.I., Arvin A., Zerboni L., et al. Current *in vivo* models of Varicella zoster virus neurotropism. *Viruses.* 2019; 11(6): 502-27. DOI: <http://doi.org/10.3390/v11060502>
4. Cohen J.I. Rodent models of varicella zoster virus neurotropism. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2010; 342: 277-89. DOI: http://doi.org/10.1007/82_2010_11
5. Depledge D.P., Sadaoka T., Ouwendijk W.D. Molecular aspects of varicella zoster virus latency. *Viruses.* 2018; 10(7): 349-70. DOI: <http://doi.org/10.3390/v10070349>

6. Baird N.L., Zhu S., Pearce C.M., Borbolla A.V. Current in vitro models to study varicella zoster virus latency and reactivation. *Viruses*. 2009; 11(2): 103-18.
DOI: <http://doi.org/10.3390/v11020103>
7. Selariu A., Cheng T., Tang Q., Silver B., Yang L., Liu C., et al. ORF7 of varicella zoster virus is a neurotropic factor. *J. Virol.* 2012; 86(16): 8614-24.
DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.00128-12>
8. Sinzger C., Knapp J., Schmidt K., Kahl M., Jahn G. A simple and rapid method for preparation of viral DNA from cell associated cytomegalovirus. *J. Virol. Methods*. 1999; 81(1-2): 115-22.
DOI: [http://doi.org/10.1016/S0166-0934\(99\)00058-0](http://doi.org/10.1016/S0166-0934(99)00058-0)
9. Osokina O.V., Barkova E.P., Nagieva F.G., Zverev V.V. The vFiraVax strain for producing an attenuated live culture vaccine for the prevention of chickenpox. Patent RF № 2693440; 2019.
10. Barkova E.P., Zverev V.V., Nagieva F.G., Osokina O.V. A method of obtaining a live culture vaccine for the prevention of chickenpox. Patent RF № 2637093; 2017.
11. Fam Kh.F., Sidorov A.V., Milovanova A.V., Antonova T.P., Lisakov A.N., Nagieva F.G., et al. New approach for diagnostics of VZV infection by using real-time PCR. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika*. 2016; 15(5): 52-8.
DOI: <http://doi.org/10.31631/2073-3046-2016-15-5-52-58> (in Russian)
12. Cohen J.I., Straus S.E., Arvin A.M., eds. Varicella zoster virus replication, pathogenesis and management. In: Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007: 24-32.
13. Depledge D.P., Kundu S., Jensen N.J., Gray E.R., Jones M., Steinberg S., et al. Deep sequencing of viral genomes provides insight into the evolution and pathogenesis of varicella zoster virus and its vaccine in humans. *Mol. Biol. Evol.* 2014; 31(2): 397-409.
DOI: <http://doi.org/10.1093/molbev/mst210>
14. Peters G.A., Tyler S.D., Carpenter J.E., Jackson W., Mori Y., Arvin A.M., et al. The attenuated genotype of varicella zoster virus includes an ORF0 transitional stop codon mutation. *J. Virol.* 2012; 86(19): 10695-703.
DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.01067-12>
15. Depledge D.P., Yamanishi K., Gomi Y., Gershon A.A., Breuer J. Deep sequencing of distinct preparations of the live attenuated varicella zoster virus vaccine reveals a conserved core of attenuating single-nucleotide polymorphisms. *J. Virol.* 2016; 90(19): 8698-704.
DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.00998-16>
16. Barrett A., Ryman K., Ni H. Method of attenuating viruses. Patent US EP0922092B1; 1999.
17. Sorel O., Messaoudi I. Varicella virus — host interactions during latency and reactivation: lessons from simian varicella virus. *Front. Microbiol.* 2018; 9: 3170-9.
DOI: <http://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03170>
18. Baird N.L., Zhu S., Pearce C.M., Viejo-Borbolla A. Current in vitro models to study varicella zoster virus latency and reactivation. *Viruses*. 2019; 11(2): 103-18.
DOI: <http://doi.org/10.3390/v11020103>
19. Gershon M., Gershon A. Varicella zoster virus and the enteric nervous system. *J. Infect. Dis.* 2018; 218(Suppl. 2): 113-9.
DOI: <http://doi.org/10.1093/infdis/jiy407>
20. Takahashi M., Hayakawa Y., Shiraki K., Yamanishi K., Asano Y., Ozaki T. Attenuation and laboratory markers of the Oka-strain varicella zoster virus. *Postgrad. Med. J.* 1985; 61(Suppl. 4): 37-46.

Информация об авторах:

Нгиева Фирая Галиевна — д.м.н., доцент, зав. лаб. гибридных клеточных культур отдела вирусологии ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова», 115088, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8204-4899>.
E-mail: fgn42@yandex.ru

Баркова Елена Петровна — к.б.н., в.н.с. лаб. гибридных клеточных культур отдела вирусологии ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова», 115088, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3369-8869>

Строева Александра Дмитриевна — м.н.с. лаб. гибридных клеточных культур отдела вирусологии ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова», 115088, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4179-931X>

Сидоров Александр Викторович — к.б.н., зав. лаб. генетики ДНК-содержащих вирусов отдела вирусологии ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова», 115088, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3561-8295>

Лотте Вера Даниловна — к.б.н., зав. межлабораторной группой электронно-микроскопических исследований отдела вирусологии ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова», 115088, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8922-0306>

Зверев Виталий Васильевич — д.б.н., проф., академик РАН, зав. лабораторией молекулярной биотехнологии ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова», 115088, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5808-2246>

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Information about the authors:

Firaya G. Nagieva — D. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Head, Laboratory of hybrid cell cultures, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 115088, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8204-4899>.
E-mail: fgn42@yandex.ru

Elena P. Barkova — PhD (Biol.), leading researcher, Laboratory of hybrid cell cultures, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 115088, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3369-8869>

Alexandra D. Stroeva — junior researcher, Laboratory of hybrid cell cultures, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 115088, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4179-931X>

Alexandr V. Sidorov — PhD (Biol.), Head, Laboratory of genetics of DNA-containing viruses, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 115088, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3561-8295>

Vera D. Lotte — PhD (Biol.), Head, Inter-laboratory group of electron microscopic studies, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 115088, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8922-0306>

Vitaly V. Zverev — Doct. Sci. (Biol.), prof., Academician of RAS, Head, Laboratory of molecular biotechnology, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5808-2246>

Contribution: the authors contributed equally to this article.



Characterization of Binding of *Varicella zoster* Virus Vaccine Strains to Preparations of Mouse Brain Membrane Receptors

Firaya G. Nagieva, Elena P. Barkova, Alexandra D. Stroeva, Alexandr V. Sidorov, Vera D. Lotte, Vitaly V. Zverev

Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, 115088, Moscow, Russia

Purpose: characterization of vFiraVax (the causative agent of chickenpox — VZV) and vZelVax (the causative agent of shingles — HZ) vaccine strains by their ability to bind to preparations of brain membrane receptors of SPF BALB/c mice.

Materials and Methods. The study was performed on cold-adapted vFiraVax VZV and vZelVax HZ vaccine strains developed by the authors on the basis of the wild-type parental pFira VZV virus (chickenpox causative agent) and the latent parental lpZel HZ virus (shingles causative agent); vOka vaccine strains isolated from vaccines against VZV infection from two manufactures (United Kingdom and USA); the HEL-3 strain of diploid cells from human embryonic lung tissue, the MC 27 strain of diploid cells from human embryonic musculocutaneous tissue, primary and diploid cells from guinea pig fetal fibroblasts. The VZV infectivity was estimated by the limiting dilution method using MC 27 cell cultures or guinea pig fetal fibroblasts. The virus titer was measured by the hemadsorption test performed with suspensions of red blood cells from guinea pig or human type 0 positive blood. Negative staining and electron microscopy were used to study the virus preparation. The immunogenicity of vFiraVax VZV and vZelVax HZ virus strains was compared with the immunogenicity of vOka VZV virus strains from different manufacturers by using a cross-neutralization test with immune sera.

Results. The Russian cold-adapted vFiraVax VZV and vZelVax HZ vaccine strains, the latent parental lpZel HZ virus and the vOka VZV vaccine strain (United Kingdom) did not bind to preparations of brain neuroreceptors of SPF BALB/c mice as distinct from the wild-type parental pFira VZV variant and vOka VZV vaccine strains (USA); the absent neurotropism of Russian vFiraVax VZV and vZelVax HZ vaccine strains is not connected with the decreased immunogenicity in relation to foreign counterparts; the electron microscope study of the vFiraVax VZV virus containing liquid concentrate detected VZV nucleocapsids.

Conclusion. The differences in the VZV ability to bind to preparations of brain membrane receptors of SPF BALB/c mice can be explained by the differences in the technology of vaccine manufacturing, including attenuation techniques, obtaining of the vaccine strain, specific characteristics of the latent parental lpZel HZ virus. The absence of the binding with brain neuroreceptors of SPF mice has been proved for the Russian vFiraVax VZV and vZelVax HZ vaccine strains which was is not connected with a decrease in their immunogenicity. The method of assessment of the binding ability of VZV vaccine strains can be used as a preliminary characteristic of neurotropism for newly created vaccine strains and for vaccine products.

Keywords: *varicella-zoster virus; wild-type parental virus; latent parental virus; cold-adapted vaccine strain; attenuated vaccine strains; preparation of mouse brain membrane receptors; infectivity of the sample; neurotropism.*

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

For citation: Nagieva F.G., Barkova E.P., Stroeva A.D., Sidorov A.V., Lotte V.D., Zverev V.V. Characterization of binding of varicella zoster virus vaccine strains to preparations of mouse brain membrane receptors. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2020; 97(2): 125–133.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-125-133>

Received 27 January 2020
Accepted 20 February 2020

Характеристика связывания вакцинных штаммов вируса *Varicella zoster* с препаратами мембранных рецепторов мозга мышей

Нагиева Ф.Г.✉, Баркова Е.П., Строева А.Д., Сидоров А.В., Лотте В.Д., Зверев В.В.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 115088, Москва, Россия

Цель работы — охарактеризовать вакцинные штаммы vFiraVax (возбудитель ветряной оспы — VZV) и vZelVax (возбудитель опоясывающего герпеса — HZ) по их способности к связыванию с препаратами мембранных рецепторов мозга SPF мышей линии BALB/c.

Материалы и методы. В работе использовали разработанные авторами на основе дикого родительского вируса rFira VZV (возбудитель ветряной оспы) и латентного родительского вируса lpZe HZ (возбудитель опоясывающего герпеса) холодоадаптированные вакцинные вирусные штаммы vFiraVax VZV и vZeIVax HZ; вакцинные штаммы vOka, выделенные из вакцин для профилактики VZV-инфекции двух производителей (Великобритания, США); штамм диплоидных клеток легких эмбриона человека ЛЭЧ-3; штамм диплоидных клеток кожно-мышечной ткани эмбриона человека KM 27; первичные и диплоидные клетки фибробластов эмбрионов морских свинок.

Инфекционную активность VZV определяли методом предельных разведений вируса на клеточных культурах KM 27 или фибробластов эмбрионов морских свинок. Титр вируса устанавливали по реакции гемадсорбции со взвесью эритроцитов морской свинки или человека «0» группы, резус плюс. Для исследования вирусного препарата в электронном микроскопе использовали метод негативного контрастирования. Иммуногенность вирусных штаммов vFiraVax VZV и vZeIVax HZ сравнивали с иммуногенностью вирусных штаммов vOka VZV разных производителей в перекрестной реакции нейтрализации иммунных сывороток.

Результаты. Отечественные холодоадаптированные вакцинные штаммы vFiraVax VZV и vZeIVax HZ, родительский латентный вирус lpZe HZ и вакцинный штамм vOka VZV (Великобритания) не связывались с препаратами нейрорецепторов мозга SPF мышей линии BALB/c в отличие от дикого родительского варианта rFira VZV и вакцинных штаммов vOka VZV (США); отсутствие нейротропности отечественных вакцинных штаммов vFiraVax VZV и vZeIVax HZ не связано со снижением иммуногенности по отношению к зарубежным аналогам; в концентрате вирусосодержащей жидкости vFiraVax VZV при электронно-микроскопическом исследовании обнаружены нуклеокапсиды VZV.

Выводы. Существуют различия в способности VZV к связыванию с препаратами мембранных рецепторов мозга SPF мышей линии BALB/c, обусловленные различиями в технологиях создания вакцин, в том числе способами аттенуации, получения вакцинного штамма, особенностями родительского латентного вируса lpZe HZ. Доказано отсутствие связывания с препаратами нейрорецепторов мозга SPF мышей линии BALB/c отечественных вакцинных штаммов vFiraVax VZV и vZeIVax HZ, не связанное со снижением их иммуногенности. Метод оценки связывающей способности вакцинных штаммов VZV может быть применен в качестве предварительной характеристики нейротропности вновь создаваемых вакцинных штаммов и вакцинных препаратов.

Ключевые слова: вирус ветряной оспы и опоясывающего герпеса; дикий родительский вирус; латентный родительский вирус; холодоадаптированный вакцинный вирусный штамм; аттенуированные вакцинные вирусные штаммы; препарат мембранного рецептора мозга мышей; инфекционность образца; нейротропность.

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

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

Для цитирования: Нагиева Ф.Г., Баркова Е.П., Строева А. Д., Сидоров А.В., Лотте В.Д., Зверев В.В. Характеристика связывания вакцинных штаммов вируса *Varicella zoster* с препаратами мембранных рецепторов мозга мышей. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2020; 97(2): 125–133.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-125-133>

Поступила 27.01.2020

Принята в печать 20.02.2020

Introduction

The varicella-zoster virus (VZV) is a highly cell-binding neurotropic human α -herpesvirus that causes chickenpox and shingles (HZ). After the primary infection, the VZV establishes persistent latent infection in sensory ganglia of the peripheral nervous system to become reactivated later at the induction of neurological disorders. Primary and recurrent VZV infections are hard to treat in patients with a weakened immune system, as the outcome depends on an efficient cell-mediated immune response. The VZV reactivation from latency in sensory nerve ganglia is a direct consequence of VZV neurotropism [1–3].

Several *in vivo* models have been developed to study VZV neurotropism, latency and reactivation [4, 5]. While being informatively valuable, these *in vivo* models are not suitable for mechanistic studies. Furthermore, they are unavailable to the wider scientific

community, as they are technically challenging, costly and are not ethically approved in some countries [6].

Experts are especially concerned about neurotropism of VZV vaccine strains. The vOka VZV vaccine strain and its ability to prevent reactivation are being debated due to its characteristic neurovirulence [7].

Most commonly, neurotropism of virus vaccine strains for cell culture-derived vaccines is studied by infecting the brain of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) susceptible to VZV.

The research paper [8] offers the method of attenuation of viruses depending on their ability to bind or not to bind to human, monkey or rodent brain membrane receptors (BMR). The authors relied on the data that the virus is not able to infect a susceptible cell, if its viral protein does not bind to the surface molecule acting as a receptor for the virus. The method of viral attenuation implies screening candidates for live virus vaccines by

selecting the virus variants that do not bind to BMR preparations. The authors' objective was to select the virus variants that do not bind to BMR preparations out of the mix of wild-type viruses and human, monkey or rodent BMR preparations; in other words, the authors offered a new method of producing attenuated viruses.

We decided to use the offered method for assessment of the ability of traditionally attenuated VZV vaccine strains to bind to preparations of mouse brain neuroreceptors.

We obtained two cold-adapted (CA) VZV strains: vFiraVax VZV and vZelVax HZ [9, 10]. The clinical isolate for vFiraVax attenuation was obtained from a healthy 6-year-old child; the isolate for vZelVax was obtained from an adult 63-year-old man during the reactivation of herpes zoster infection. For both CA viral strains, we thoroughly studied their biological activity in different cell cultures, biological markers of attenuation, and *in vivo* immunogenicity in guinea pigs. The method of obtaining vaccine preparations is distinct in the specific attenuation of strains at lower temperatures and in creating vaccines from extracellular virus-containing materials.

Purpose: assessment of the ability of the Russian CA VZV strains and their foreign counterparts to bind to BMR preparations of SPF BALB/c mice.

Materials and Methods

The study was performed on the strain of diploid cells from human embryonic lung tissue (HEL-3), the strain of diploid cells from human embryonic musculocutaneous tissue (MC 27), the primary cell culture of guinea pig fetal fibroblasts (pcGPF) and the strain of diploid cells from guinea pig fetal fibroblasts (dcGPF). Cell cultures were grown in a DMEM/F-12 (PanEco) medium with 10 mM HEPES, 5% fetal calf serum (FCS; HyClone) with addition of 2 mM L-glutamine and 40 µg/ml gentamicin.

The studied viruses were as follows:

- wild-type parental pFira VZV virus variant — pFira VZV;
- CA vFiraVax VZV vaccine strain — vFiraVax VZV;
- latent parental lpZel HZ variant — lpZel HZ;
- CA vZelVax HZ vaccine virus strain — vZelVax HZ;
- vOka VZV vaccine virus strain, isolated from vaccine against VZV infection (USA) — vOka VZV (USA);
- vOka VZV vaccine virus strain, isolated from vaccine against VZV infection (United Kingdom) — vOka VZV (UK).

The wild-type virus variants — pFira VZV and lpZel HZ — were attenuated by using a traditional method of passaging clinical isolates at a lower temperature (30°C) in cell cultures: HEL-3 — 12 passages, pcGPF — 6 passages, HEL-3 — another 2 passages. The duration of one passage was 10 days.

The VZV infectivity was estimated by using MC 27 or dcGPF cell culture grown on 24-well plates. The seeding density was 10^5 cells/well. A tenfold dilution of the virus-containing fluid (VCF) was performed from 10^{-1} to 10^{-10} ; 0.1 ml of VCF was added to the plate wells with testing culture. The contact between VCF and the cell monolayer lasted 1.0–1.5 hours at 36.5°C. Upon completion of the contact, all the wells, including control wells with uninfected cells, were filled with 0.9 ml of maintenance medium — DMEM with 2% FCS. The virus titer was measured on the 7th day from the time of infection by using a hemadsorption test performed with 0.25% suspension of red blood cells from guinea pig or human type 0 positive blood. The virus titer corresponded to the highest virus dilution causing hemadsorption in 50% of infected cultures, with no hemadsorption in control uninfected cell cultures.

The 0.25% guinea pig or human red blood cell suspension was prepared by three-time washing of red blood cells with normal saline 0.9% NaCl. 0.3 ml of red blood cell suspension was added to each well with infected and uninfected control cells prewashed with phosphate-buffered saline (PBS). The suspension was left for 30 min at 4°C and for another 30 min at room temperature. Then the plate wells were washed three times with normal saline 0.9% NaCl to wash away red blood cells; the presence or absence of hemadsorption was registered with a light microscope ($\times 70$).

Guinea pigs, 300–400 g in weight, were immunized subcutaneously with a single vaccine dose containing VZV vaccine strains: vFiraVax VZV, vZelVax HZ, vOka VZV (USA). Cardiac puncture was made on the 37th and 80th days after the immunization. The obtained immune sera were treated with RDE-11 (Seiken) to remove thermolabile and thermostable inhibitors of serological tests.

The cross-neutralization test was performed on MC 27 cell culture grown on 24-well plates (Costar). The cells were grown in a DMEM/F-12 medium with 5% FCS, 2 mM of glutamine and 40 µg/ml of gentamicin. In total, 10 dilutions of the immune virus-specific serum were prepared in two steps, starting from 1: 50. 0.2 ml of 1000 doses (1 vaccine dose in 0.1 ml) was added to each immune serum dilution; then the mixture was vortexed and left for 1 hour at 37°C, being vortexed repeatedly every 15 minutes. After the medium was removed from the 24-well plates with grown cells, 0.1 ml of the mixture was added to every 2 wells of the same dilution and was left in an incubator for 1 hour at 37°C and 5% CO₂. After the contact was over, 0.8 ml of DMEM maintenance medium with 2% FCS was added to each well, and the cultivation continued for 7 days. Each plate received virus dose control and cell control.

The dcGPF cell culture was grown in 3 culture flasks with a surface area of 175 cm². After the uniform cell monolayer was formed, the medium was removed

from the flasks; the cell monolayer was washed twice with PBS containing Ca^{2+} and Mg^{2+} ions; 5 ml of HEL-3 cell suspension infected with vFiraVax VZV was added to the cell monolayer. The contact between the infected cells and the cell monolayer continued 2 hours at 30°C. After completion of the contact, 35 ml of DMEM maintenance serum-free medium was added to the infected culture flasks, and the cultivation continued for 14 days at 30°C. Then the culture flasks containing infected cells were frozen three times at 70°C and then thawed repeatedly. The infected cell suspension in a volume of 100 cm³ was centrifuged at 4,000 rpm (Gouan) during 15 minutes at 4°C. The resulting supernatant was removed into centrifuge tubes for further ultracentrifugation in an Optima centrifuge, Rotor SW 32T, at 25,000 rpm during 3 hours. The residue collected in the tris-buffer was checked for infectivity and handed over for electron microscopy.

Electron microscopy. Negative staining was used to study preparations with an electron microscope. In the above method, we used non-selective absorption of samples present in the suspension and an electron microscopic grid coated with formvar film stabilized with carbon. One of the immunoelectron microscopy methods was used to increase the amount of virus-specific samples on the film. In compliance with this method, samples were adsorbed to a carbon-formvar film pre-sensitized with VZV immune serum. All preparations were fixed in 4% paraformaldehyde pH 7.0, rinsed with PBS and counterstained with 1% solution of phosphotungstic acid pH 7.0.

The preparations were studied in a GEM-100 CX electron microscope at a magnification of 58,000 and photographed by using AQFA film.

Total DNA isolation. Viral DNA was isolated from the samples by using the standard method of phenol-chloroform extraction [9] with some modifications, namely: After alcohol precipitation, the samples were additionally purified through microdialysis by using the following centrifugal filters: Ultra 0.5 ml 3K membrane (Millipore). The purification was performed 5 times; 480 µl of Tris 10 mM was added to 20 µl of the sample that was further centrifuged.

DNA nonspecific amplification. To increase the amount of viral DNA in the samples we performed nonspecific amplification with the help of a Ready-To-Go GenomiPhi V3 DNA Amplification Kit and using the manufacturer's protocol.

The real-time PCR was conducted by using the described technique [11]. The reaction mixture for PCR was prepared immediately before PCR (1 reaction requires: 10 µl 2.5X buffer with Taq-polymerase; 1 µl TaqMan probe VZV 29 at a concentration of 10 µM; 2 µl forward and reverse primers at a concentration of 5 µM; 7 µl water). PCR was conducted with Prime 95 DT thermal cycler (DNA Technology), following the protocol: Initial denaturation at 95°C for 120 sec, then 45 cycles at 95°C for 15 sec and at 55°C

for 60 sec. The reaction results were measured by the threshold cycle, using the software of the thermal cycler manufacturer.

Cloning and sequencing of viral DNA. The DNA samples were used as matrices to amplify a 815 base-pair DNA fragment of viral genome encoding open reading frames 0 and 1; the following primers were used: CGCCAGCCTTTAACAAAAC (forward) and TATTTTTGGGATCCGCAATG (reverse). PCR was performed with a TProfessional Gradient thermal cycler (Biometra) and with the Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, following the recommendations of the fragment manufacturer.

The PCR products were treated one time with Taq-polymerase (to receive 3'-A ends); then they were cloned in a pAL2-T vector (Evrogen) with the help of T4 DNA-ligase to be further transformed into a *E. coli* XLBlue strain to go further through screening by using the antibiotic ampicillin as a selection marker and through blue-white screening with a chromogenic substrate X-Gal.

Plasmid DNA was isolated from individual clones and then analyzed by using agarose gel electrophoresis in the presence of ethidium bromide, then nucleotide sequences of insertions were identified. The synthesis of primers and sequencing was commissioned to Evrogen and Syntol.

Bioinformatic methods. To design primers and probes, to decide on a cloning strategy and to analyze nucleotide sequences we used Vector NTI software.

Obtaining mouse BMR. Brains we dissected out of 15–20 heads of 4-week-old SpF BALB/c mice, measured their weight (4.7–6.3 g), added 50 mM tris-buffer pH 7.6 and homogenized in a Dounce homogenizer. The homogenate was centrifuged in a benchtop centrifuge at 14,000 rpm at 4°C during 15 min. The weight-volume ratio was 1 : 7. The supernatant was decanted, then the buffer was added in the same volume to the precipitate and the process was repeated twice. Between the 2nd and the 3rd centrifugation, the homogenate was incubated at 37°C during 10 min. The final precipitate was resuspended in DMEM medium with 2% FCS; the moist brains were stored at –70°C until use. The protein concentration in the brain mix was measured with a NanoPhotometer NP 89-Touch spectrophotometer. The protein concentration in the precipitate must be within a 20–40 mg/ml range. In our tests, we used 38–40 mg/ml of the preparation of BMR of SpF BALB/c mice.

Determination of residual infection activity after binding of the virus to mouse brain neuroreceptors. 100 µl of VCF of pFira VZV (2nd passage), vFiraVax VZV (20th passage), lpZel HZ (2nd passage), vZelVax HZ (20th passage), vOka (USA), vOka (UK) strains were used to add 900 µl of brain neuroreceptors of SpF BALB/c mice. 100 µl of VCF of the above VZV variants were used to add 900 µl of tris-buffer. Con-

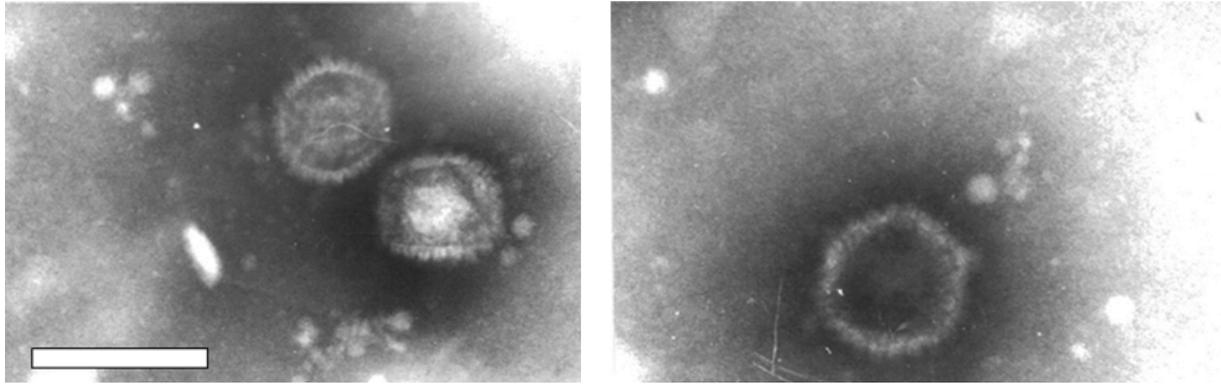


Fig. 1. Electron microscopy ($\times 150,000$), the scale bar corresponds to 100 nm.

trol: 900 μ l of mouse brain neuroreceptors was added to 100 μ l of tris-buffer. All the above listed samples were incubated at 37°C during 30 min, including regular shaking every 5 min. Then all the samples were centrifuged at 14,000 rpm during 15 min to remove the membrane material and bound virus.

The residual viral infectivity of the samples was checked in the supernatant through titration and using the limiting dilution method in VZV-sensitive dcGPF cell cultures. The infectivity was estimated with the help of hemadsorption test with 0.25% suspension of red blood cells from guinea pigs.

The data were analyzed with the help of GraphPad Prism statistical software.

Results

To confirm the VZV presence in the study material we analyzed the vFiraVax VZV strain VCF concentrate with an electron microscope. The negative staining technique detected only nucleocapsids of the CA vFiraVax VZV strain at the 20th passage level (**Fig. 1**). For reasons not yet understood, virions of extracellular VZV VCF have not been detected by electron microscopy [12].

The virus identity was also confirmed by using partial sequencing of isolated plasmid DNA fragments encoding *orf 0* of pFira VZV and lpZel HZ strains on the 8th passage. The genome section equal to 580 nucleotide sequences of DNA of VZV variants partially attenuated at a lower temperature was compared with the European strain Dumas and with Japanese pOka VZV and vOka VZV strains (**Fig. 2**).

The preliminary phylogenetic analysis showed that partially attenuated pFira and lpZel VZV variants, which are used in creating Russian CA vaccine strains, are closely related to strain Dumas, thus corresponding to the European VZV type, and are slightly different from the Japanese genotype (**Fig. 3**).

The mutation in position 567 (T567C, Stop-Arg) (**Fig. 2**) is one of the molecular determinants of the weakening virus in vaccine strains as compared to wild-type viruses. The comparative analysis of viral nucleotide sequences showed that pFira VZV and lpZel HZ

strains are partially attenuated during earlier passages and do not contain the mutation typical of attenuated vaccine strains [13–15].

The most important feature of live attenuated vaccines is their higher efficiency as compared to inactivated vaccines, as they are able to produce stronger innate and adaptive humoral and cellular immune responses.

The immune serum for the CA vFiraVax VZV virus strain, which was obtained on the 37th and 80th days

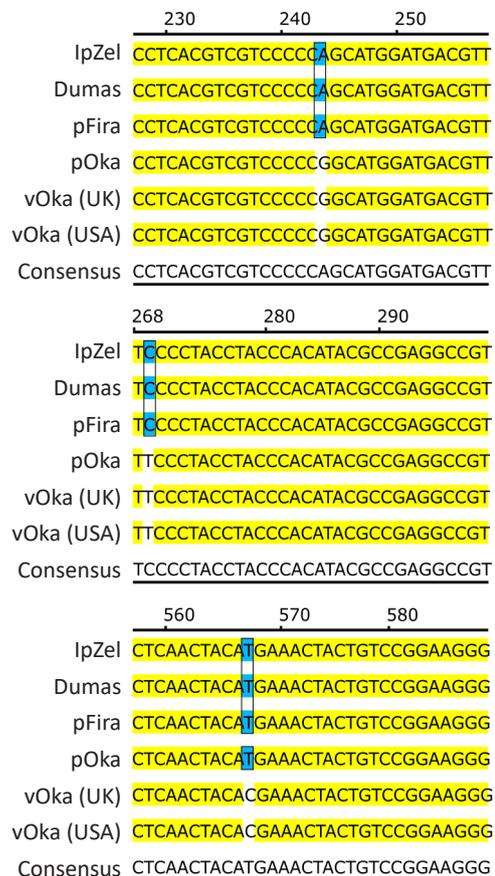


Fig. 2. Alignment of the nucleotide sequences of the viral DNA of strains of Varicella zoster virus (VZV).

Dumas — European wild-type VZV.

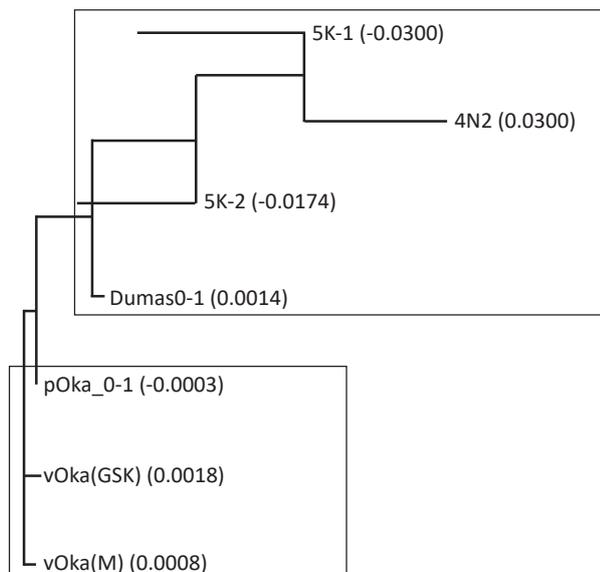


Fig. 3. Phylogenetic analysis of various VZV strains.

5K1 and 5K2 — isolate clones pFira; 4N2 — isolate clone lpZel.

after the immunization of guinea pigs, equally efficiently neutralized all the three VZV strains (**Fig. 4**): The highest neutralizing activity was demonstrated with the homologous strain, while the lowest activity was observed with the vOka VZV (USA) vaccine strain. The immune serum for the vOka VZV (USA) vaccine strain, which was obtained on the 37th day after the immunization of guinea pigs, equally efficiently neutralized all the three VZV strains, including the homologous vOka VZV (USA) vaccine strain.

The immune serum for the vOka VZV (USA) strain, which was obtained on the 80th day after the immunization, had slightly different neutralizing activity. This high-titer immune serum neutralized all the three

studied VZV strains. The results obtained from the cross-neutralization test clearly demonstrated that domestic CA vFiraVax VZV and vZelVax HZ strains were as good as the vOka VZV (USA) strain in terms of their immunogenicity *in vivo* testing in guinea pigs.

The specific characteristics of VZV binding to brain neuroreceptors of SPF BALB/c mice were assessed through comparison of wild-type viruses with attenuated vaccine strains [16]. When the CA vFiraVax VZV strain of the 20th passage was compared with its wild-type parental variant of the 2nd passage, it was found that the wild-type pFira VZV virus variant binds to the preparation of brain neuroreceptors of SPF BALB/c mice, having a binding index of 2.0 lg HAU_{50/0.1 ml} (Table); the binding percentage is 25.03, while vFiraVax VZV lost completely nervous tissue tropism.

A different picture is demonstrated by the latent parental lpZel HZ virus of shingles, which existed for over 50 years in sensory nerve ganglia of a 63-year-old patient; it continuously reactivated and caused post-herpetic neuralgia. This latent parental lpZel HZ virus and its CA vZelVax HZ vaccine strain lost tropism to nervous tissue of SPF BALB/c mouse brain.

Interestingly, the vOka VZV (USA) vaccine strain can bind to preparations of brain neuroreceptors of SPF BALB/c mice. The binding index is 1.0 lg HAU_{50/0.1 ml}; the binding percentage is 15.4. On the other hand, the vOka VZV (UK) virus strain lost tropism to brain neuroreceptors of SPF BALB/c mice. In our opinion, the different binding ability of the same Japanese vOka VZV vaccine strain can be explained by different background of passages in cell cultures from different manufacturers.

Thus, the relatively simple method of assessment of the ability of VZV vaccine strains to bind to brain

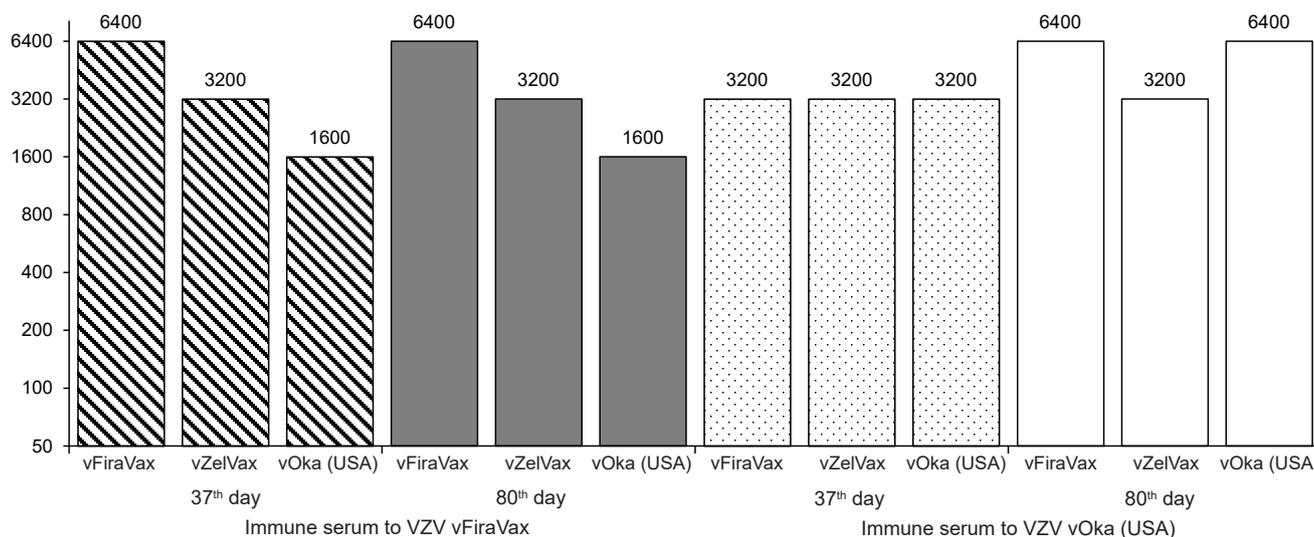


Fig. 4. Cross-neutralization test of attenuated VZV strains (1,000 doses) with immune serums of guinea pigs on the 37th and 80th days since the immunization.

Ordinate: Neutralization titers of immune serums: 100% protection.

Comparative assessment of the binding of VZV strains to BMR preparations SPF BALB/c mice

Viral strain	Infectivity, lg HAU _{50/0,1 ml}		p	The binding index, lg HAU _{50/0,1 ml}	Binding, %
	virus + buffer (n = 4)	virus + BMR (n = 4)			
vFiraVax VZV	7.5 ± 0.029	8.5 ± 0.036	<0.001	-1.0	0
pFira VZV	8.5 ± 0.051	6.5 ± 0.035	<0.001	2.0	25.03
vZelVax HZ	7.5 ± 0.041	7.5 ± 0.029	>0.05	0	0
lpZel HZ	8.0 ± 0.041	8.5 ± 0.046	<0.05	-0.5	0
vOka VZV (UK)	7.0 ± 0.034	7.5 ± 0.029	<0.05	-0.5	0
vOka VZV (USA)	6.5 ± 0.005	5.5 ± 0.055	<0.001	1.0	15.4

Note: BMR — brain membrane receptors; HAU — hemoadsorbition unit.

neuroreceptors of SPF BALB/c mice can be important for preliminary evaluation of neurotropism of new vaccine strains.

The tests clearly demonstrated that the Russian CA vFiraVax VZV и vZelVax HZ strains, which we created, do not bind to rodent brain neuroreceptors in contrast to their wild-type parental variants.

Discussion

Although the present-day varicella vaccines are substantially attenuated, they can retain residual neurovirulence and damage sensory ganglia. The factors participating in invasion of neurons and in establishment of latency are still not clear [7].

In vivo studies of VZV neurotropism involve problems, as the virus causes diseases only in people and rhesus monkeys (*Macacca mulatta*) [17]. These studies are challenging and costly [18–20].

The purpose of our study was to characterize varicella zoster virus vaccine strains — vFiraVax VZV and vZelVax HZ — by their ability to bind to preparations of brain membrane receptors of SPF BALB/c mice.

Prior to performing the main test for checking the ability of VZV vaccine strains, which we created, to bind to brain neuroreceptors of SPF mice of the BALB/c line, we used the electron microscopy data to check for the presence of nucleocapsids in the VCF concentrate of vFiraVax VZV vaccine strain and we used the findings of partial sequencing of the isolated plasmid DNA fragments encoding *orf 0* to confirm their similarity to the European VZV strains.

Then we compared the main and the most important function of vaccine strains — immunogenicity *in vivo*. For this purpose, we conducted a cross-neutralization test by using vFiraVax VZV and vZelVax HZ vaccine strains as well as foreign vOka VZV (USA) strains and sera from guinea pigs immunized subcutaneously with a single vaccine dose. The immunogenicity of all the studied strains was high, and the Russian vaccine strains were as good as the foreign

vOka VZV (USA) vaccine strain in terms of immunogenicity.

In our tests, the wild-type parental pFira variant bound to the mouse BMR preparation as distinct from its CA vFiraVax VZV vaccine strain. On the other hand, the latent parental lpZel variant and the CA vZelVax HZ vaccine strain did not bind to the mouse BMR preparations. The tests demonstrated difference in the binding ability of the vOka VZV vaccine strain obtained from vaccines from different manufacturers: vOka VZV (UK) vaccine strain did not bind to mouse brain membrane receptors, while the binding index for vOka VZV (USA) vaccine strain was 1 lg HAU 50/0.1 ml.

The above differences, in our opinion, can be explained by differences in the technology of manufacturing vaccines based on the vOka VZV vaccine strain: the intracellular virus bound to the cell material, the extracellular virus-containing material used by foreign and Russian manufacturers, different methods of attenuation [9] and obtaining of the vaccine strain, the specific characteristics of the parental lpZel HZ virus due to long staying of the latent virus in human nerve ganglia. The study confirmed the absence of binding to mouse brain neuroreceptors for the Russian vaccine strains boasting immunogenicity comparable with the immunogenicity of the foreign counterparts; it also proved that the proposed method can be used for the preliminary assessment of VZV neurotropism in newly created vaccine strains and vaccine preparations.

REFERENCES

1. Zerboni L., Reichett M., Arvin A. Varicella zoster virus neurotropism in SCID mouse-human dorsal root ganglia xenografts. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 2010; 342: 255-76. DOI: http://doi.org/10.1007/82_2009_8
2. Reiss C.S. *Neurotropic Viral Infections. Volume 562.* Cambridge: Cambridge University Press; 2008. DOI: <http://doi.org/10.1017/CBO9780511541728>
3. Mahalingam R., Gershon A., Gershon M., Cohen J.I., Arvin A., Zerboni L., et. al. Current *in vivo* models of Varicella zoster virus neurotropism viruses. *Viruses.* 2019; 11(6): 502-27. DOI: <http://doi.org/10.3390/v11060502>

4. Cohen J.I. Rodent models of varicella zoster virus neurotropism. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2010; 342: 277-89.
DOI: http://doi.org/10.1007/82_2010_11
5. Depledge D.P., Sadaoka T., Ouwendijk W.D. Molecular aspects of varicella zoster virus latency. *Viruses.* 2018; 10(7): 349-70.
DOI: <http://doi.org/10.3390/v10070349>
6. Baird N.L., Zhu S., Pearce C.M., Borbolla A.V. Current in vitro models to study varicella zoster virus latency and reactivation. *Viruses.* 2009; 11(2): 103-18.
DOI: <http://doi.org/10.3390/v11020103>
7. Selariu A., Cheng T., Tang Q., Silver B., Yang L, Liu C., et al. ORF7 of varicella zoster virus is a neurotropic factor. *J. Virol.* 2012; 86(16): 8614-24.
DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.00128-12>
8. Sinzger C., Knapp J., Schmidt K., Kahl M., Jahn G. A simple and rapid method for preparation of viral DNA from cell associated cytomegalovirus. *J. Virol. Methods.* 1999; 81(1-2): 115-22.
DOI: [http://doi.org/10.1016/s0166-0934\(99\)00058-0](http://doi.org/10.1016/s0166-0934(99)00058-0)
9. Osokina O.V., Barkova E.P., Nagieva F.G., Zverev V.V. The vFiraVax strain for producing an attenuated live culture vaccine for the prevention of chickenpox. Patent RF № 2693440; 2019.
10. Barkova E.P., Zverev V.V., Nagieva F.G., Osokina O.V. A method of obtaining a live culture vaccine for the prevention of chickenpox. Patent RF № 2637093; 2017.
11. Fam Kh.F., Sidorov A.V., Milovanova A.V., Antonova T.P., Lisakov A.N., Nagieva F.G., et al. New approach for diagnostics of VZV infection by using real-time PCR. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika.* 2016; 15(5): 52-8.
DOI: <http://doi.org/10.31631/2073-3046-2016-15-5-52-58> (in Russian)
12. Cohen J.I., Straus S.E., Arvin A.M., eds. Varicella zoster virus replication, pathogenesis and management. In: Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Fields Virology.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007: 24-32.
13. Depledge D.P., Kundu S., Jensen N.J., Gray E.R., Jones M., Steinberg S., et al. Deep sequencing of viral genomes provides insight into the evolution and pathogenesis of varicella zoster virus and its vaccine in humans. *Mol. Biol. Evol.* 2014; 31(2): 397-409.
DOI: <http://doi.org/10.1093/molbev/mst210>
14. Peters G.A., Tyler S.D., Carpenter J.E., Jackson W., Mori Y., Arvin A.M., et al. The attenuated genotype of varicella zoster virus includes an ORF0 transitional stop codon mutation. *J. Virol.* 2012; 86(19): 10695-703.
DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.01067-12>
15. Depledge D.P., Yamanishi K., Gomi Y., Gershon A.A., Breuer J. Deep sequencing of distinct preparations of the live attenuated varicella zoster virus vaccine reveals a conserved core of attenuating single-nucleotide polymorphisms. *J. Virol.* 2016; 90(19): 8698-704.
DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.00998-16>
16. Barrett A., Ryman K., Ni H. Method of attenuating viruses. Patent US EP0922092B1; 1999.
17. Sorel O., Messaoudi I. Varicella virus — host interactions during latency and reactivation: lessons from simian varicella virus. *Front. Microbiol.* 2018; 9: 3170-9.
DOI: <http://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03170>
18. Baird N.L., Zhu S., Pearce C.M., Viejo-Borbolla A. Current in vitro models to study varicella zoster virus latency and reactivation. *Viruses.* 2019; 11(2): 103-18.
DOI: <http://doi.org/10.3390/v11020103>
19. Gershon M., Gershon A. Varicella zoster virus and the enteric nervous system. *J. Infect. Dis.* 2018; 218(Suppl. 2): 113-9.
DOI: <http://doi.org/10.1093/infdis/jiy407>
20. Takahashi M., Hayakawa Y., Shiraki K., Yamanishi K., Asano Y., Ozaki T. Attenuation and laboratory markers of the Okazaki strain varicella zoster virus. *Postgrad. Med. J.* 1985; 61(Suppl. 4): 37-46.
21. Zerboni L., Reichett M., Arvin A. Varicella zoster virus neurotropism in SCID mouse-human dorsal root ganglia xenografts. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2010; 342: 255-76.
DOI: http://doi.org/10.1007/82_2009_8
22. Reiss C.S. *Neurotropic Viral Infections.* Volume 562. Cambridge: Cambridge University Press; 2008.
DOI: <http://doi.org/10.1017/CBO9780511541728>
23. Mahalingam R., Gershon A., Gershon M., Cohen J.I., Arvin A., Zerboni L., et al. Current in vivo models of Varicella zoster virus neurotropism viruses. *Viruses.* 2019; 11(6): 502-27.
DOI: <http://doi.org/10.3390/v11060502>
24. Cohen J.I. Rodent models of varicella zoster virus neurotropism. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2010; 342: 277-89.
DOI: http://doi.org/10.1007/82_2010_11
25. Depledge D.P., Sadaoka T., Ouwendijk W.D. Molecular aspects of varicella zoster virus latency. *Viruses.* 2018; 10(7): 349-70.
DOI: <http://doi.org/10.3390/v10070349>
26. Baird N.L., Zhu S., Pearce C.M., Borbolla A.V. Current in vitro models to study varicella zoster virus latency and reactivation. *Viruses.* 2009; 11(2): 103-18.
DOI: <http://doi.org/10.3390/v11020103>
27. Selariu A., Cheng T., Tang Q., Silver B., Yang L, Liu C., et al. ORF7 of Varicella zoster virus is a neurotropic factor. *J. Virol.* 2012; 86(16): 8614-24.
DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.00128-12>
28. Sinzger C., Knapp J., Schmidt K., Kahl M., Jahn G. A simple and rapid method for preparation of viral DNA from cell associated cytomegalovirus. *J. Virol. Methods.* 1999; 81(1-2): 115-22.
DOI: [http://doi.org/10.1016/s0166-0934\(99\)00058-0](http://doi.org/10.1016/s0166-0934(99)00058-0)
29. Осокина О.В., Баркова Е.П., Нагиева Ф.Г., Зверев В.В. Штамм "vfiravax" для получения аттенуированной живой культуральной вакцины для профилактики ветряной оспы. Патент РФ № 2693440; 2019.
30. Баркова Е.П., Зверев В.В., Нагиева Ф.Г., Осокина О.В. Способ получения живой культуральной аттенуированной вакцины для профилактики ветряной оспы. Патент РФ № 2637093; 2017.
31. Фам Х.Ф., Сидоров А.В., Милованова А.В., Антонова Т.П., Лисаков А.Н., Нагиева Ф.Г. и др. Новый подход к диагностике Varicella zoster – вирусной инфекции с использованием ПЦР в режиме реального времени. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2016; 15(5): 52-8.
DOI: <http://doi.org/10.31631/2073-3046-2016-15-5-52-58>
32. Cohen J.I., Straus S.E., Arvin A.M., eds. Varicella zoster virus replication, pathogenesis and management. In: Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Fields Virology.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007: 24-32.
33. Depledge D.P., Kundu S., Jensen N.J., Gray E.R., Jones M., Steinberg S., et al. Deep sequencing of viral genomes provides insight into the evolution and pathogenesis of varicella zoster virus and its vaccine in humans. *Mol. Biol. Evol.* 2014; 31(2): 397-409.
DOI: <http://doi.org/10.1093/molbev/mst210>
34. Peters G.A., Tyler S.D., Carpenter J.E., Jackson W., Mori Y., Arvin A.M., et al. The attenuated genotype of varicella zoster virus includes an ORF0 transitional stop codon mutation. *J. Virol.* 2012; 86(19): 10695-703.
DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.01067-12>
35. Depledge D.P., Yamanishi K., Gomi Y., Gershon A.A., Breuer J. Deep sequencing of distinct preparations of the live attenuated varicella zoster virus vaccine reveals a conserved core of attenuating single-nucleotide polymorphisms. *J. Virol.* 2016; 90(19): 8698-704.
DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.00998-16>

16. Barrett A., Ryman K., Ni H. Method of attenuating viruses. Patent US EP0922092B1; 1999.
17. Sorel O., Messaoudi I. Varicella virus – host interactions during latency and reactivation: lessons from simian varicella virus. *Front. Microbiol.* 2018; 9: 3170-9.
DOI: <http://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03170>
18. Baird N.L., Zhu S., Pearce C.M., Viejo-Borbolla A. Current in vitro models to study varicella zoster virus latency and reactivation. *Viruses.* 2019; 11(2): 103-18.
DOI: <http://doi.org/10.3390/v11020103>
19. Gershon M., Gershon A. Varicella zoster virus and the enteric nervous system. *J. Infect. Dis.* 2018; 218(Suppl. 2): 113-9.
DOI: <http://doi.org/10.1093/infdis/jiy407>
20. Takahashi M., Hayakawa Y., Shiraki K., Yamanishi K., Asano Y., Ozaki T. Attenuation and laboratory markers of the Okazaki strain varicella zoster virus. *Postgrad. Med. J.* 1985; 61(Suppl. 4): 37-46.

Information about the authors:

Firaya G. Nagieva  — D. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Head, Laboratory of hybrid cell cultures, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 115088, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8204-4899>.
E-mail: fgn42@yandex.ru

Elena P. Barkova — PhD (Biol.), leading researcher, Laboratory of hybrid cell cultures, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 115088, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3369-8869>

Alexandra D. Stroevea — junior researcher, Laboratory of hybrid cell cultures, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 115088, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4179-931X>

Alexandr V. Sidorov — PhD (Biol.), Head, Laboratory of genetics of DNA-containing viruses, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 115088, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3561-8295>

Vera D. Lotte — PhD (Biol.), Head, Inter-laboratory group of electron microscopic studies, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 115088, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8922-0306>

Vitaly V. Zverev — D. Sci. (Biol.), Prof., Academician of the Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of molecular biotechnology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 115088, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5808-2246>

Contribution: the authors contributed equally to this article.

Информация об авторах:

Нагиева Фирая Галиевна  — д.м.н., доцент, зав. лаб. гибридных клеточных культур отдела вирусологии ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова», 115088, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8204-4899>.
E-mail: fgn42@yandex.ru

Баркова Елена Петровна — к.б.н., в.н.с. лаб. гибридных клеточных культур отдела вирусологии ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова», 115088, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3369-8869>

Строева Александра Дмитриевна — м.н.с. лаб. гибридных клеточных культур отдела вирусологии ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова», 115088, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4179-931X>

Сидоров Александр Викторович — к.б.н., зав. лаб. генетики ДНК-содержащих вирусов отдела вирусологии ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова», 115088, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3561-8295>

Лотте Вера Даниловна — к.б.н., зав. межлабораторной группой электронно-микроскопических исследований отдела вирусологии ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова», 115088, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8922-0306>

Зверев Виталий Васильевич — д.б.н., проф., академик РАН, зав. лабораторией молекулярной биотехнологии ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова», 115088, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5808-2246>

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.



Бесклеточная коклюшная вакцина из антигенов свежевыделенного штамма *B. pertussis* серовара 1.2.3

Зайцев Е.М.[✉], Бажанова И.Г., Брицина М.В., Мерцалова Н.У., Озерецковская М.Н.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», 105064, Москва, Россия

Цель работы — разработка технологии изготовления бесклеточной коклюшной вакцины (БКВ) из свежевыделенного штамма *B. pertussis* серовара 1.2.3 и изучение ее протективной активности и безопасности в сравнении с препаратом из вакцинных штаммов.

Материалы и методы. Использовали штаммы *B. pertussis*: свежевыделенный штамм № 211, серовариант 1.2.3; вакцинные штаммы № 305, серовариант 1.2.0 и № 475а, серовариант 1.2.3. По оригинальной методике из супернатанта жидкой среды культивирования *B. pertussis* штамма № 211 получена БКВ и изучены ее протективные и токсические свойства.

Результаты. Исследования показали, что для получения БКВ, состоящей из антигенов свежевыделенного штамма, требуется использование обогащенных питательных сред при культивировании штамма и увеличение срока детоксикации комплекса протективных антигенов, выделенного из среды культивирования штамма. БКВ, полученная из свежевыделенного штамма, обладала протективными свойствами, в 1,7 раза превышающими протективные свойства БКВ, полученной из вакцинных штаммов, при отсутствии токсических свойств и низких сенсibilизирующих свойствах. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования свежевыделенного штамма № 211 для получения коклюшных вакцин.

Ключевые слова: штаммы *B. pertussis*; обогащенные питательные среды; культивирование; детоксикация; бесклеточная коклюшная вакцина; протективные свойства; лейкоцитозстимулирующая активность; гистаминсенсibilизирующая активность.

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

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

Для цитирования: Зайцев Е.М., Бажанова И.Г., Брицина М.В., Мерцалова Н.У., Озерецковская М.Н. Бесклеточная коклюшная вакцина из антигенов свежевыделенного штамма *B. pertussis* серовара 1.2.3. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2020; 97(2): 134–139.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-134-139>

Поступила 25.11.2019

Принята в печать 12.01.2020

Cell-free pertussis vaccine from antigens of freshly isolated strain of *B. pertussis* serotype 1.2.3

Evgeniy M. Zaitsev[✉], Irina G. Bazhanova, Marina V. Britsina, Natalia U. Mertsalova, Mariya N. Ozeretskovskaya

Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, 105064, Russia

Aim. Development of technology for the manufacture of cell-free pertussis vaccine (CPV) from a freshly isolated strain of *B. pertussis* No. 211 serotype 1.2.3 and the study of its protective activity and safety in comparison with the preparation of vaccine strains.

Materials and methods. Following *B. pertussis* strains were used: freshly isolated strain No. 211, serotype 1.2.3; vaccine strains No. 305, serotype 1.2.0, and No. 475a, serotype 1.2.3. According to the original method, a CPV was obtained from the supernatant of the liquid culture medium of *B. pertussis* strain No. 211 and its protective and toxic properties were studied.

Results. Studies have shown that the use of enriched nutrient media for the cultivation of the strain and the increase in the duration of the the detoxification period of the protective antigen complex isolated from the culture medium are needed to obtain a CPV vaccine consisting of antigens of a freshly isolated strain. CPV obtained from the freshly isolated strain had protectivity 1.7 times higher compared to those of CPV obtained from vaccine strains, was nontoxic and had a low sensitizing properties. The results indicate that the freshly isolated strain No. 211 is a promising candidate for use in the development of pertussis vaccines.

Keywords: *B. pertussis* strains; enriched nutrient media; cultivation; detoxification; cell-free pertussis vaccine; protective properties; leukocytosis-stimulating activity; histamine-sensitizing activity.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

For citation: Zaitsev E.M., Bazhanova I.G., Britsina M.V., Mertsalova N.U., Ozeretskovskaya M.N. Cell-free pertussis vaccine from antigens of freshly isolated strain of *B. pertussis* serotype 1.2.3. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(2): 134–139. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-134-139>

Received 25 November 2019

Accepted 12 January 2020

Введение

Коклюш — заболевание, вызываемое бактериями *Bordetella pertussis*, наиболее опасен для неиммунизированных младенцев [1, 2]. По данным ВОЗ, в 2016 г. заболеваемость на 100 тыс. детей в возрасте до 14 лет составляла 30,392. Вакцинация против коклюша, начавшаяся с 1940 г., резко снизила уровень заболеваемости, однако в последующие годы снова началось постепенное увеличение числа вспышек коклюша во всем мире, особенно в последнее десятилетие, несмотря на высокий уровень вакцинации населения [3–6].

Во многих странах мира проведено изучение генома *B. pertussis*, показавшее, что одной из причин продолжающегося эпидемического процесса коклюша является несоответствие генотипов вакцинных штаммов *B. pertussis* генотипам циркулирующих в настоящее время штаммов. Молекулярно-генетический анализ штаммов *B. pertussis* выявил аллельные варианты генов, кодирующих продукцию S1 субъединицы коклюшного токсина (*ptxA*), пертактина (*prn*), фимбриальных белков (*fim2* и *fim3*) и некоторых других факторов вирулентности.

Популяция циркулирующих штаммов *B. pertussis* в большинстве случаев имеет аллельный вариант *ptxP3* гена промотора коклюшного токсина и *ptxA1* аллель гена коклюшного токсина; доминируют штаммы, имеющие *prn2* и *prn3* аллели гена пертактина; отмечается тенденция к увеличению доли штаммов с *fim2-2* и *fim3B* аллелями фимбриальных генов. У вакцинных штаммов преобладают *ptxA2* и *ptxA4* аллели гена коклюшного токсина, аллель *ptxP1* промотора коклюшного токсина, *prn1* аллель гена пертактина, *fim2-1* и *fim3A* аллели генов фимбрий. Выделенные в 2006–2012 гг. в России изоляты содержали 14 генотипов, из которых 98,6% соответствовали новым невакцинным генотипам *ptxP3*, *fim3B*, *fim3A*, *prn2/prn4/prn3/prn9* — штаммы № 322 и № 329 и смешанным генотипам невакцинных *prn9* и вакцинных *ptxP2/fim3A* аллелей — штамм № 219; невакцинного *ptxP3/prn2* и вакцинного *fim3A* аллелей — штамм № 312. В 2013–2015 гг. штаммы *B. pertussis* № 329 и № 322 доминировали в России, вызывая тяжелые клинические формы коклюша [1].

Свежевыделенный штамм № 211, использованный в настоящей работе для изготовления коклюшной вакцины, был выделен от больного коклюшем ребенка в 2003 г. и характеризуется аллельным вариантом *ptxA1* гена коклюшного токсина, аллельным вариантом *ptxP3* гена промотора коклюшного токсина, аллельным вариантом *prn2* гена пертактина, аллельным вариантом *fim2-1* гена *fim2*, аллельным вариантом *fim3B* гена *fim3*. В вакцинном штамме № 305 ген *ptxA* характеризуется аллельным вариантом *ptxA2*, а в штамме № 475а — аллельным вариантом *ptxA4*; ген промотора коклюшного токсина — аллелем *ptxP1*; ген пертактина — аллельным вариантом *prn1*, гены фимбрий — аллельными вариантами *fim2-1* и *fim3A* для обоих штаммов [8].

Таким образом, циркулирующие в настоящее время штаммы содержат измененные последовательности генов коклюшного токсина, фимбрий и пертактина, отличающиеся от последовательностей в штаммах довакцинального периода. Изменения генома возбудителя коклюша ставят вопрос о необходимости создания вакцин нового поколения и замены старых вакцинных штаммов на новые [7]. В связи с этим актуальными являются отбор и характеристика свежевыделенных штаммов в качестве кандидатов для производства современных коклюшных вакцин. При этом важное значение имеет отбор штаммов, имеющих полный набор агглютиногенов: 1.2.3.

Цель исследования — разработка технологии изготовления бесклеточной коклюшной вакцины (БКВ) из свежевыделенного штамма *B. pertussis* № 211 серовара 1.2.3 и изучение ее протективной активности и безопасности в сравнении с препаратом из вакцинных штаммов.

Материалы и методы

В опытах использованы мыши-гибриды F₁ массой 10–12 и 14–16 г.

Штамм *B. pertussis* № 211, серовариант 1.2.3 выделен у больного ребенка. Изучены вакцинные штаммы № 305, серовариант 1.2.0 и № 475а, серовариант 1.2.3 (селекционированный из штамма № 475).

Питательные среды:

- казеиново-угольный агар (КУА);
- агар Борде–Жангу с 20–30% крови человека;
- жидкая синтетическая питательная среда (ЖСС), содержащая аминокислоты, соли и витамины;
- жидкая полусинтетическая питательная среда (ЖПС) — модификация среды Коэна–Виллера с добавлением протеинового ингредиента (казеиновый гидролизат).

Проверку морфологических, серологических и культуральных свойств штамма проводили в соответствии с Методическими указаниями¹. Для оценки серовара штаммов использовали сыворотки диагностические коклюшные к агглютиногенам 1.2.3 и паракклюшные к агглютиногену 14 адсорбированные, для реакции агглютинации — «Медгамал», серия 92, серия 78, сухие.

Для получения необходимого количества биомассы свежeweделенного штамма № 211 были апробированы 3 схемы культивирования. При схеме I микробные клетки культивировали в условиях, используемых для выращивания вакцинных штаммов. Штамм восстанавливали из сухого состояния на плотных средах Борде–Жангу с 20–25% крови человека (1-й пассаж). Культуры после бактериологического контроля на чистоту пересеивали на пробирки со средой КУА и выращивали в течение 16–18 ч (2-й пассаж), затем культуры выращивали в ЖСС с использованием шуттель-аппарата в течение 16–18 ч (динамическое культивирование, 3-й пассаж). На конечном этапе микробные клетки выращивали в ЖСС в стационарных условиях в течение 5 сут (4-й пассаж).

По схеме II 2-й пассаж культур проводили на среде КУА с 5% крови человека.

В соответствии со схемой III 2-й пассаж также проводили на среде КУА с 5% крови человека, а 3-й пассаж осуществляли в динамических условиях с использованием ЖПС. Четвертый пассаж заключался в культивировании в ЖСС в стационарных условиях.

Вирулентность свежeweделенных и вакцинных штаммов определяли на модели экспериментального менингоэнцефалита у мышей. Мышам вводили интрацеребрально три дозы культуры *B. pertussis* в объеме 0,03 мл с последующим учетом количества павших животных в течение 2 нед и расчетом LD₅₀.

БКВ была получена по оригинальной методике из супернатанта жидкой среды культивирования *B. pertussis* штаммов № 211, 305 и 475a [9, 10].

Протективную активность БКВ исследовали на модели экспериментального менингоэнцефалита у мышей при интрацеребральном заражении

иммунизированных мышей вирулентной культурой штамма *B. pertussis* № 18323. Результаты учитывали в течение 2 нед после заражения². Контрольных мышей заражали интрацеребрально двукратными дозами микробных взвесей культуры штамма *B. pertussis* № 18323 в объеме 0,03 мл с последующим наблюдением в течение 14 сут, учетом количества павших животных и расчетом LD₅₀.

Лейкоцитозстимулирующую активность (ЛСА), токсичность и гистаминсенсibiliзирующие свойства препаратов проверяли в соответствии с правилами проведения доклинических исследований лекарственных средств [11].

LD₅₀ и МЗЕ/мл (международная защитная единица в 1 мл вакцины) рассчитывали по методу Вильсона и Вустера с использованием таблиц Национального института здоровья США.

Результаты

Изучение морфологических, серологических и культуральных свойств штамма № 211 показало, что он отвечает требованиям, предъявляемым к гладкой форме (фаза 1) бактерий и может быть использован для производства коклюшных вакцин. Коклюшные бактерии штамма № 211 — неподвижные, грамтрицательные, овоидной формы мелкие палочки — располагались в мазках отдельно или парами. На среде Борде–Жангу колонии круглые, сероватого цвета, мелкие, блестящие, выпуклые. При постановке развернутой реакции агглютинации культура штамма № 211 с диагностическими коклюшными сыворотками к видовым агглютиногенам 1.2.3 проявляла активность в разведениях 1:1280, 1:160 и 1:640 соответственно, культура агглютинировалась коклюшной антибактериальной сывороткой.

Свежeweделенный штамм № 211 *B. pertussis* отличался высокими вирулентными свойствами (LD₅₀ ≤ 4,8 млн микробных клеток) и в 3,7 раза превышал вирулентность вакцинных штаммов (LD₅₀ = 18,2 ± 2,6 млн микробных клеток).

Важным этапом технологии изготовления БКВ является культивирование штаммов для получения биомассы, достаточной для выделения комплекса протективных антигенов. При выращивании на плотной среде КУА (схема I) свежeweделенный штамм давал скудный рост, а при дальнейшем культивировании в ЖСС накопление биомассы было недостаточным для выделения комплекса протективных антигенов (15,6 ± 0,5 МОЕ/мл). Использование схемы II позволило улучшить рост культур на плотной среде, однако выход биомассы оставался недостаточным (37,1 ± 3,8 МОЕ/мл). Для выделения комплекса протективных антигенов из надосадочной жидкости среды культивирования *B. pertussis*

¹ МУК 4.2.2317-08. Отбор, проверка и хранение производственных штаммов коклюшных, паракклюшных и бронхосептикозных бактерий. М.; 2009.

² МУК 4.1/4.2.588-96. Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям. М.; 1998.

выход биомассы, в соответствии с ранее полученными данными по изготовлению БКВ из вакцинных штаммов, должен быть не ниже 50 МОЕ/мл.

Наиболее высокий выход биомассы был отмечен при использовании схемы III — накопление биомассы было достаточным для выделения комплекса антигенов из надосадочной жидкости культуры и составляло $68,7 \pm 4,6$ МОЕ/мл.

Одним из этапов технологии изготовления БКВ является детоксикация комплекса антигенов, выделенного из надосадочной жидкости среды культивирования штаммов. Результаты детоксикации оценивали на мышах в тесте по определению ЛСА, которая по требованиям ВОЗ не должна превышать 1 ЕД. На 1-м этапе исследований была использована методика, ранее отработанная при изготовлении БКВ из вакцинных штаммов, согласно которой детоксикацию антигенного комплекса *B. pertussis* проводили в течение 17 сут. ЛСА антигенного комплекса из штамма № 211 до детоксикации составляла $10,2 \pm 2,4$ ЕД, а после детоксикации — 1,2 ЕД. В связи с этим был увеличен срок детоксикации комплекса до 19–21 сут. При детоксикации в течение 19 сут индекс ЛСА составлял 0,49 ЕД и практически не изменялся при дальнейшем увеличении срока детоксикации.

С использованием детоксицированных комплексов антигенов, выделенных из среды культивирования свежесыведенного и вакцинных штаммов, были приготовлены два варианта БКВ:

- БКВ1 содержала в 1 иммунизирующей дозе для человека 25 мкг белка антигенного комплекса свежесыведенного штамма *B. pertussis* № 211;
- БКВ2 содержала в 1 иммунизирующей дозе для человека 25 мкг (в соотношении 1:1) белка антигенных комплексов вакцинных штаммов *B. pertussis* № 305 и 475а.

Все исследованные варианты вакцин обладали выраженной защитной активностью (не менее 8 МЗЕ/мл) и соответствовали требованиям ВОЗ (таблица). Следует отметить, что протективная активность БКВ1 (17,1 МЗЕ/мл) в 1,7 раза превышала таковую у БКВ2 (10,2 МЗЕ/мл). Токсичность препаратов была исследована в тесте изменения массы тела мышей в дозе 25 мкг (рекомендуемой для человека). Все препараты были безвредны в испытываемой дозе (прибавка массы тела мышей по отношению к контролю составляла более 60%), что свидетельствует об отсутствии токсичности у испытываемых вакцин.

Получение мышами БКВ в дозах 25, 50 и 100 мкг не вызывало гибели животных после введения дигидрохлорида гистамина. Гистаминсенсibiliзирующая доза ($ГСД_{50}$) была более 100 мкг. $ГСД_{50}$ отраслевого стандартного образца токсичности (ОСО-5) коклюшных вакцин составляла 4,8 МОЕ/мл. Таким образом, в одной иммунизирующей дозе (25 мкг) БКВ содержится 0,25 $ГСД_{50}$, что в 8,4 раза ниже, чем

Генотипическая характеристика штаммов *B. pertussis* и биологические свойства бесклеточных коклюшных вакцин, изготовленных на их основе

Genetic characteristics of *B. pertussis* strains and biological properties of cell-free pertussis vaccines manufactured on their basis

Препарат БКВ (штаммы) CPV (strains)	Генетическая характеристика штаммов Genetic characteristics of the strains			Биологические свойства вакцин Biological properties of the vaccines			
				протективная активность protective activity		безопасность в тесте изменения массы тела мышей safety in the test of changes in the mice body weight	
	<i>fim 2, 3</i>	<i>ptxA/ptxP</i>	<i>prn</i>	в ЕД ₅₀ , мл in ED ₅₀ , ml	в МЗЕ/мл in IPU/ml	прирост массы, г weight gain, g	прирост, % по отношению к контролю (физиологический раствор ≥60%) weight gain, % relative to control (PBS ≥60%)
БКВ1 (свежесыведенный штамм № 211) CPV1 (211 strain freshly isolated)	<i>fim2-1</i> <i>fim3B</i>	<i>ptxA1/ptxP3</i>	<i>prn2</i>	0,021 (0,014–0,032)	17,1	3,0 ± 0,1	93,7
БКВ2 (вакцинные штаммы № 305, 475а) CPV2 (305, 475a vaccine strains)	<i>fim2-1</i> <i>fim3A</i>	<i>ptxA2/ptxP1</i> <i>ptxA4/ptxP1</i>	<i>prn1</i>	0,035 (0,021–0,041)	10,2	2,6 ± 0,1	81,2
Отраслевой стандартный образец иммуногенности (ОСО-3) Industry standard of immunogenicity				0,012 (0,009–0,019)			
Физиологический раствор PBS						3,2 ± 0,09	

в ОСО-5, содержащем в одной иммунизирующей дозе (10 МОЕ) 2,1 ГСД₅₀. Полученные результаты свидетельствуют о низких сенсибилизирующих свойствах БКВ из свежeweделенного и вакцинных штаммов, соответствующих требованиям ВОЗ.

Обсуждение

Для изготовления БКВ был использован штамм № 211, выделенный в 2003 г. от больного коклюшем ребенка, соответствующий по генотипическим характеристикам современной циркулирующей популяции возбудителя коклюша и, как большинство циркулирующих штаммов, отличающийся по генотипическим характеристикам от штаммов, используемых в производстве коклюшных вакцин. Одним из критериев отбора данного штамма как источника протективных антигенов для изготовления БКВ является его принадлежность по генотипу к штаммам *B. pertussis*, доминирующим в настоящее время в России и несущим промотор коклюшного токсина *ptxP3* и серовариант 1.2.3. Однако вирулентность штаммов определяется увеличением не только продукции коклюшного токсина, но и адгезивных свойств штаммов, о чем свидетельствует преимущество штамма № 211, серовар 1.2.3. Для решения поставленной задачи были разработаны оптимальные условия культивирования свежeweделенного штамма и режим детоксикации комплекса протективных антигенов, оценена протективная активность и безопасность БКВ из антигенов этого штамма. Использование обогащенных питательных сред позволило получить достаточно высокий уровень выхода биомассы. При детоксикации комплекса антигенов из свежeweделенного штамма в условиях, отработанных для вакцинных штаммов, ЛСА составляла 1,2 ЕД. Увеличение срока детоксикации до 19 дней позволило снизить ЛСА до 0,49 ЕД.

С использованием детоксицированных комплексов протективных антигенов, выделенных из среды культивирования свежeweделенного и вакцинных штаммов, были приготовлены два варианта БКВ. Изучение протективных свойств полученных препаратов показало, что все исследованные варианты БКВ обладали выраженной защитной активностью (не менее 8 МЗЕ/мл), а также отсутствием токсических и сенсибилизирующих свойств. При этом по содержанию МЗЕ/мл БКВ, изготовленная из комплекса антигенов свежeweделенного штамма, в 1,7 раза превосходила БКВ, полученную из вакцинных штаммов, что свидетельствует о высокой протективной активности данной БКВ. Одной из возможных причин увеличения протективной активности является повышенная вирулентность штамма № 211, несущего новый аллельный вариант промотора гена *ptxP3*, связанного с повышенной продукцией коклюшного токсина и увеличением

адгезивных свойств, связанных с продукцией фимбрий 2 и 3 [3, 12].

Преимуществами штамма № 211 являются высокая вирулентность, в 3,7 раза превышающая вирулентность вакцинных штаммов, соответствие его генотипа циркулирующим в настоящее время в России штаммам *B. pertussis*, экспрессия полного набора агглютиногенов 1, 2 и 3, высокий выход биомассы при культивировании в жидкой питательной среде и повышенные протективные свойства полученной из него БКВ. Штамм № 211 депонирован в «Научном центре экспертизы средств медицинского применения» под № 317 от 15.09.2017. Получен патент № 2689903 «Свежeweделенный штамм бактерий *Bordetella pertussis* — продуцент комплекса протективных антигенов для производства бесклеточной коклюшной вакцины». В целом полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования свежeweделенного штамма № 211 для производства БКВ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Борисова О.Ю., Гадуа Н.Т., Пименова А.С., Петрова М.С., Попова О.П., Алешкин В.А. и др. Структура популяции штаммов возбудителя коклюша на территории России. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016; 15(4): 22-8. DOI: <http://doi.org/10.31631/2073-3046-2016-15-4-22-28>
2. Еженедельный эпидемиологический бюллетень. Вакцины против коклюша: документ по позиции ВОЗ — август 2015; 35. Available at: https://www.who.int/immunization/policy/position_papers/pp_pertussis_august2015_ru.pdf
3. Anselmo A., Buttinelli G., Ciammaruconi A., Midulla F., Nicolai A., Fortunato A., et al. Draft genome sequence of a *Bordetella pertussis* strain with the virulence-associated allelic variant *ptxP3*, isolated in Italy. *Genome Announc.* 2015; 3(5): e00944-15. DOI: <http://doi.org/10.1128/genomeA.00944-15>
4. Bailon H., León-Janampa N., Padilla C., Hozbor D. Increase in pertussis cases along with high prevalence of two emerging genotypes of *Bordetella pertussis* in Perú, 2012. *BMC Infect. Dis.* 2016; 16: 422. DOI: <http://doi.org/10.1186/s12879-016-1700-2>
5. Carbonetti N.H., Wirsing von König C.H., Lan R., Jacob-Dubuisson F., Cotter P.A., Deora R., et al. Highlights of the 11th International *Bordetella* Symposium: from basic biology to vaccine development. *Clin. Vaccine Immunol.* 2016; 23(11): 842-50. DOI: <http://doi.org/10.1128/CVI.00388-16>
6. van Gent M., Heuvelman C.J., van der Heide H.G., Hallander H.O., Advani A., Guiso N., et al. Analysis of *Bordetella pertussis* clinical isolates circulating in European countries during the period 1998–2012. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2015; 34(4): 821-30. DOI: <http://doi.org/10.1007/s10096-014-2297-2>
7. Семин Е.Г., Синяшина М.Н., Медкова А.Ю., Каратаев Г.И. Конструирование рекомбинантных аттенуированных бактерий *Bordetella pertussis* генотипа РТхР3. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2018; (4): 33-41. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-4-33-41>
8. Мазурова И.К., Борисова О.Ю., Комбарова С.Ю., Гадуа Н.Т., Агешкин В.А. Динамика изменчивости основных генов патогенности штаммов *B. pertussis*, выделенных от больных коклюшем в Москве (1948–2005 гг.). *Молекулярная медицина*. 2008; (1): 40-5.

9. Зайцев Е.М., Бажанова И.Г., Брицина М.В. Протективная активность и безопасность бесклеточной коклюшной вакцины из вакцинных и свежесвищенного штамма *Bordetella pertussis*. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2017; 16(2): 31-4.
 DOI: <http://doi.org/10.31631/2073-3046-2017-16-2-31-34>
10. Захарова Н.С., Брицина М.В., Мерцалова Н.У., Бажанова И.Г., Озерецковская М.Н., Зайцев Е.М. и др. Отечественная бесклеточная коклюшная вакцина. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2008; (1): 35-41.
11. Миронов А.Н. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты)*. Часть 2. М.: Гриф и К; 2012.
12. Bart M.L., van Gent M., van der Heide H.G., Boekhorst J., Hermans P., Parkhill J., et al. Comparative genomics of prevaccination and modern *Bordetella pertussis* strains. *BMC Genomics*. 2010; 11: 627. DOI: <http://doi.org/10.1186/1471-2164-11-627>
5. Carbonetti N.H., Wirsing von König C.H., Lan R., Jacob-Dubuisson F., Cotter P.A., Deora R., et al. Highlights of the 11th International *Bordetella* Symposium: from basic biology to vaccine development. *Clin. Vaccine Immunol.* 2016; 23(11): 842-50.
 DOI: <http://doi.org/10.1128/0372-9311-2016-4-33-41> (in Russian)
6. van Gent M., Heuvelman C.J., van der Heide H.G., Hallander H.O., Advani A., Guiso N., et al. Analysis of *Bordetella pertussis* clinical isolates circulating in European countries during the period 1998–2012. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2015; 34(4): 821-30.
 DOI: <http://doi.org/10.1007/s10096-014-2297-2>
7. Semin E.G., Sinyashina M.N., Medkova A.Yu., Karataev G.I. Construction of recombinant attenuated *Bordetella pertussis* bacteria of ptxp3 genotype. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2018; (4): 33-41.
 DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-4-33-41> (in Russian)
8. Mazurova I.K., Borisova O.Yu., Kombarova S.Yu., Gadua N.T., Ageshkin V.A. Trends in the variability of major pathogenicity genes of *Bordetella pertussis* strains isolated from patients with pertussis in Moscow (1948–2005). *Molekulyarnaya meditsina*. 2008; (1): 40-5. (in Russian)
9. Zaytsev E.M., Bazhanova I.G., Britsina M.V. Protective activity and safety of acellular pertussis vaccine from vaccine and freshly isolated strain *Bordetella pertussis*. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika*. 2017; 16(2): 31-4.
 DOI: <http://doi.org/10.31631/2073-3046-2017-16-2-31-34> (in Russian)
10. Zakhharova N.S., Britsina M.V., Mertsalova N.U., Bazhanova I.G., Ozeretskovskaya M.N., Zaytsev E.M., et al. Domestic acellular pertussis vaccine. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2008; (1): 35-41. (in Russian)
11. Mironov A.N. *Guidelines for Preclinical Studies of Drugs (Immunobiological Drugs)*. Part 2. Moscow: Grif i K; 2012. (in Russian)
12. Bart M.L., van Gent M., van der Heide H.G., Boekhorst J., Hermans P., Parkhill J., et al. Comparative genomics of prevaccination and modern *Bordetella pertussis* strains. *BMC Genomics*. 2010; 11: 627.
 DOI: <http://doi.org/10.1186/1471-2164-11-627>

REFERENCES

1. Borisova O.Yu., Gadua N.T., Pimenova A.S., Petrova M.S., Popova O.P., Aleshkin V.A., et al. Structure of population of strains of the *Bordetella pertussis* in the Russia. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika*. 2016; 15(4): 22-8.
 DOI: <http://doi.org/10.31631/2073-3046-2016-15-4-22-28> (in Russian)
2. Weekly Epidemiological Record (WER). WHO position paper on pertussis vaccines — August 2015. Available at: <https://www.who.int/wer/2015/wer9035.pdf>
3. Anselmo A., Buttinelli G., Ciammaruconi A., Midulla F., Nicolai A., Fortunato A., et al. Draft genome sequence of a *Bordetella pertussis* strain with the virulence-associated allelic variant ptxP3, isolated in Italy. *Genome Announc.* 2015; 3(5): e00944-15. DOI: <http://doi.org/10.1128/genomeA.00944-15>
4. Bailon H., León-Janampa N., Padilla C., Hozbor D. Increase in pertussis cases along with high prevalence of two emerging genotypes of *Bordetella pertussis* in Perú, 2012. *BMC Infect. Dis.* 2016; 16: 422.
 DOI: <http://doi.org/10.1186/s12879-016-1700-2>

Информация об авторах:

Зайцев Евгений Михайлович[✉] — д.м.н., зав. лаб. иммуномодуляторов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Россия.
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4813-9074>.
 E-mail: pertussis@yandex.ru

Бажанова Ирина Глебовна — к.б.н., в.н.с. лаб. иммуномодуляторов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Россия.
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1404-1498>.
 E-mail: ibajanowa@yandex.ru

Брицина Марина Васильевна — к.б.н., в.н.с. лаб. иммуномодуляторов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Россия.
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3044-0790>.
 E-mail: britsinamarina@yandex.ru

Мерцалова Наталия Устиновна — к.б.н., в.н.с. лаб. иммуномодуляторов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Россия.
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9072-2538>.
 E-mail: n.mertzalova@yandex.ru

Озерецковская Мария Николаевна — к.м.н., в.н.с. лаб. иммуномодуляторов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Россия.
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9809-4217>.
 E-mail: manja33@yandex.ru

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Information about the authors:

Evgeniy M. Zaitsev[✉] — D. Sci. (Med.), Head, Laboratory of immunomodulators, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, 105064, Russia.
 ORCID <https://orcid.org/0000-0002-4813-9074>.
 E-mail: pertussis@yandex.ru

Irina G. Bazhanova — PhD (Biol.), leading researcher, Laboratory of immunomodulators, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, 105064, Russia.
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1404-1498>.
 E-mail: ibajanowa@yandex.ru

Marina V. Britsina — PhD (Biol.), leading researcher, Laboratory of immunomodulators, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, 105064, Russia.
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3044-0790>.
 E-mail: britsinamarina@yandex.ru

Natalia U. Mertsalova — PhD (Biol.), leading researcher, Laboratory of immunomodulators, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, 105064, Russia.
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9072-2538>.
 E-mail: n.mertzalova@yandex.ru

Mariya N. Ozeretskovskaya — PhD (Med.), leading researcher, Laboratory of immunomodulators, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, 105064, Russia.
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9809-4217>.
 E-mail: manja33@yandex.ru

Contribution: the authors contributed equally to this article.



Роль вирусов гриппа в развитии тяжелых форм острых респираторных инфекций у пациентов, госпитализированных в стационары г. Екатеринбурга в эпидемический сезон 2017–2018 гг.

Алимов А.В.¹, Смирнова С.С.^{1,2}, Леленкова Е.В.^{1✉}, Маркарян А.Ю.¹, Вялых И.В.¹,
Веревицков В.К.², Комиссаров А.Б.³, Соминина А.А.³

¹Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 620030, Екатеринбург, Россия;

²ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, 620028, Екатеринбург, Россия;

³ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, 197376, Санкт-Петербург, Россия

Цель. Изучить роль вирусов гриппа в развитии тяжелых форм острых респираторных инфекций (ТОРИ) у пациентов, госпитализированных в стационары Екатеринбурга в период эпидемического сезона 2017–2018 гг.

Материалы и методы. Проведен ретроспективный эпидемиологический анализ заболеваемости гриппом в г. Екатеринбурге, изучены 403 индивидуальные карты больных, госпитализированных с гриппом и ТОРИ в стационары города, проведены диагностические исследования респираторных вирусных инфекций методом полимеразной цепной реакции.

Результаты. За период эпидемического подъема переболело 27,0% населения г. Екатеринбурга, госпитализировано 1,8%. В исследование включено 5,6% госпитализированных пациентов. Частота обнаружения РНК вирусов гриппа А и В в материалах от госпитализированных больных с ТОРИ составила 28,3%. Частота ПЦР-детекции вирусов гриппа В линии Ямагата, А(Н1N1)pdm09, А(Н3N2) составила 46,5, 20,2 и 10,5% соответственно.

Заключение. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что вирусы гриппа остаются значимыми возбудителями ТОРИ, требующих госпитализации. Среди пациентов с ТОРИ, включенных в исследование, наибольшая заболеваемость отмечалась среди детей младшей возрастной группы и была обусловлена преимущественно вирусами гриппа В линии Ямагата и гриппа А(Н1N1)pdm09. По результатам молекулярно-генетического исследования вирусы гриппа А(Н1N1)pdm09 принадлежали к клайду 6В.1, несли характерные аминокислотные замены в гемагглютинине S84N, S162N (с приобретением потенциального сайта гликозилирования) и I216T и были подобны вакцинному штамму A/Michigan/45/2015. Исследованные вирусы гриппа В относились к линии Ямагата, клайду 3. Вирус гриппа В/Ekaterinburg/RII-4723S/2018 отличался от референс-штамма В/Phuket/3073/2013 двумя аминокислотными заменами в гене гемагглютинина M251V и L172Q.

Ключевые слова: вирусы гриппа; респираторные вирусы; молекулярно-генетический анализ; тяжелые острые респираторные инфекции; заболеваемость.

Источник финансирования. Исследование выполнено в рамках международной программы «Глобальный госпитальный надзор за гриппом» (GHSN) при поддержке Фонда по эпидемиологии гриппа (Франция).

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

Для цитирования: Алимов А.В., Смирнова С.С., Леленкова Е.В., Маркарян А.Ю., Вялых И.В., Веревицков В.К., Комиссаров А.Б., Соминина А.А. Роль вирусов гриппа в развитии тяжелых форм острых респираторных инфекций у пациентов, госпитализированных в стационары г. Екатеринбурга в эпидемический сезон 2017–2018 гг. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2020; 97(2): 140–149.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-140-149>

Поступила 20.11.2019

Принята в печать 12.01.2020

The Role of Influenza Viruses in the Development of Severe Acute Respiratory Infection in Patients Admitted to Yekaterinburg Hospitals during 2017–2018 Epidemic Season

Aleksandr V. Alimov¹, Svetlana S. Smirnova^{1,2}, Evgeniya V. Lelenkova^{1✉}, Aleksandr Yu. Markaryan¹, Ivan V. Vyalykh¹, Vladislav K. Verevshchikov², Andrey B. Komissarov³, Anna A. Sominina³

¹Yekaterinburg Research Institute of Viral Infections, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», 620030, Yekaterinburg, Russia;

²Ural State Medical University, 620028, Yekaterinburg, Russia;

³Smorodintsev Research Institute of Influenza, 197376, Saint-Petersburg, Russia

Objective. To study the role of influenza viruses in the development of severe acute respiratory infections (SARI) in patients admitted to Yekaterinburg hospitals during 2017–2018 epidemic season.

Materials and Methods. A retrospective epidemiological analysis of influenza incidence in Yekaterinburg was conducted, 403 influenza and acute respiratory viral infections case sheets were studied, and PCR analysis of clinical samples from the patients for respiratory viral infections was performed.

Results. During the epidemic period a total 27.0% of the Yekaterinburg population were reported with influenza and other SARI, with 1.8% patients hospitalized. 5.6% of the total number of patients admitted with influenza and SARI in Yekaterinburg hospitals were included in the study. The rate of the detection of influenza A and B viruses RNA in the clinical samples from the patients with SARI was 28.3%. The rates of the detection in PCR of influenza B/Yamagata, A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) were 46.5, 20.2 and 10.5%, respectively.

Conclusion. The study results indicated that influenza viruses remain significant pathogens of respiratory infections that required hospitalization. Among patients with SARI the highest incidence was observed in children of a younger age group and was mainly associated with influenza B virus of Yamagata lineage and influenza A virus (H1N1)pdm09. According to the results of a molecular genetic study, influenza A (H1N1) pdm09 viruses belonged to clade 6B.1, carried characteristic amino acid substitutions in hemagglutinin S84N, S162N (with the acquisition of a potential glycosylation site) and I216T and were similar to the A/Michigan/45/2015 vaccine strain. The influenza B viruses studied belonged to the Yamagata lineage, clade 3. The influenza B/Ekaterinburg /RII-4723S/2018 virus differed from the reference strain B/Phuket/3073/2013 by two amino acid substitutions in the hemagglutinin gene M251V and L172Q.

Keywords: influenza viruses; respiratory viruses; molecular genetic testing; severe acute respiratory infections; incidence.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

For citation: Alimov A.V., Smirnova S.S., Lelenkova E.V., Markaryan A.Yu., Vyalykh I.V., Verevshchikov V.K., Komissarov A.B., Sominina A.A. The Role of Influenza Viruses in the Development of Severe Acute Respiratory Infection in Patients Admitted to Yekaterinburg Hospitals during 2017–2018 Epidemic Season. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(2): 140–149. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-140-149>

Received 20 November 2019

Accepted 12 January 2020

Введение

На сегодняшний день грипп является инфекцией, которая имеет характер глобального распространения. Ежегодно в мире грипп уносит жизни порядка 550 тыс. человек, в том числе около 100 тыс. смертельных исходов регистрируется среди детей, особенно в возрасте до 5 лет. Известно, что частая смена антигенных вариантов вируса гриппа, появление реассортантов увеличивают риск возникновения пандемического вируса гриппа, что влечет за собой стремительный рост заболеваемости среди различных возрастных групп населения с большой вероятностью неблагоприятного исхода [1–5]. Таким образом, анализ причин и факторов риска развития тяжелых форм гриппа в целях снижения заболеваемости и развития тяжелых форм острых респираторных инфекций (ТОРИ), особенно у детей, является одной из важнейших задач здравоохранения [6, 7].

В Российской Федерации одним из направлений оптимизации системы эпидемиологического надзора за гриппом и ОРВИ стало внедрение в 2009 г. системы сигнального надзора в рамках Глобальной системы надзора за гриппом (GISRS). Задачами этой системы стали выявление и регистрация случаев ТОРИ, анализ их этиологии, клинико-эпидемиологических особенностей и факторов риска развития [7–11].

В настоящее время в России в системе сигнального надзора работают 10 регионов страны. Многолетние данные показали, что результаты сигнального надзора значительно дополняют традиционную систему надзора и имеют существенную взаимосвязь с данными, полученными в других странах мира [8, 10]. В масштабах Уральского региона подобные исследования не проводились.

Цель работы — изучить роль вирусов в развитии ТОРИ у пациентов, госпитализированных в

стационары г. Екатеринбурга в период эпидемического сезона 2017–2018 гг.

Материалы и методы

Наблюдения проведены согласно международным правилам и рекомендациям Европейского бюро ВОЗ с общепринятой методикой по определению стандартных случаев ТОРИ [12], а также с заполнением унифицированных индивидуальных карт больных согласно протоколу Глобальной системы госпитального надзора за гриппом и стандартным операционным процедурам. Карты заполняли ответственные врачи-исследователи больниц, затем их передавали в ФБУН «ЕНИИ-ВИ» Роспотребнадзора вместе с клиническими образцами от больных. Анализируемая база данных содержала следующую информацию: пол, возраст, даты заболевания, сбора клинического материала для исследований, результаты ПЦР-диагностики, клиническая симптоматика, диагнозы при поступлении и выписке, сопутствующие соматические заболевания, число госпитализаций, вакцинальный статус, исход заболевания.

Критерии включения в исследование:

- госпитализация пациента предположительно связана с гриппозной инфекцией;
- пациент является жителем г. Екатеринбурга;
- пациент дал личное письменное информированное согласие на участие в исследовании;
- клинические образцы взяты в течение 24–48 ч от даты госпитализации;
- заболевание возникло в течение предшествующих 7 дней с такими проявлениями, как лихорадка более 38°C, кашель, одышка или затрудненное дыхание.

Кодировку диагнозов осуществляли в соответствии с МКБ-10:

- J06 — острые инфекции верхних дыхательных путей множественной и неуточненной локализации;
- J20.9 — острый бронхит неуточненный;
- J18 — пневмония неуточненная;
- J00 — острый назофарингит, насморк;
- J45.8 — смешанная астма;
- J44.8 — другая уточненная хроническая обструктивная легочная болезнь (ХОБЛ);
- J44.1 — ХОБЛ с обострением (неуточненная).

Критерии исключения из исследования: пациенты из учреждений закрытого типа, наличие данных о госпитализации в стационар в течение предыдущих 30 дней до заболевания.

В соответствии с критериями отбора и стандартным определением случая ТОРИ в исследование было включено 403 пациента с ТОРИ, среди них 245 (60,8%) детей и 158 (39,2%) взрослых. Среди пациентов преобладали дети младшей возраст-

Таблица 1. Возрастная структура пациентов, включенных в исследование (Екатеринбург, эпидемический сезон 2017–2018 гг., %)

Table 1. The age structure of patients included in the study (Yekaterinburg, epidemic season 2017–2018, %)

Возраст, годы Age, years	Число пациентов Number of patients	Доля возрастных групп, % Share of age groups, %
0–2	123	30,5
3–6	72	17,9
7–14	32	7,9
15–17	18	4,5
Дети, всего Children, total	245	60,8
18–64	109	27,0
65 и старше 65 and older	49	12,2
Взрослые, всего Adults, total	158	39,2
Всего Total	403	100,0

ной группы 0–2 лет (30,5%), 17,9% составили дети в возрасте 3–6 лет. Доля детей школьного возраста (7–14 лет) была 7,9%, подростков — 4,5%. Среди взрослых пациентов значительную часть (27,0%) составили лица трудоспособного возраста 18–64 лет. Доля лиц старших возрастов (65 лет и старше) составила 12,2% (табл. 1).

В гендерной структуре пациентов доля мужчин составила 52,6% (212 человек), женщин — 47,4% (191 человек). Госпитализация пациентов осуществлялась в инфекционные стационары города, в том числе 1,7% (7 человек) — в отделения реанимации и интенсивной терапии. Летальных исходов среди больных, включенных в исследование, не зарегистрировано.

Для проведения лабораторной диагностики у пациентов брали мазки со слизистой глотки и носа. Забор клинических образцов производили в транспортную среду «Соран» («Sorana Italia SpA»), их транспортировку осуществляли согласно СП 1.2.036-95¹.

ПЦР-диагностика. Выделение РНК проводили из 100 мкл клинического материала с использованием набора реагентов «РИБО-преп», синтез кДНК проводили с использованием набора реагентов «Реверта-L» в соответствии с инструкциями производителя. Клинический материал исследо-

¹ Санитарные правила 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности» (утв. Постановлением Госкомсанэпиднадзора РФ от 28.08.1995 № 14).

Результаты

вали с целью выявления и типирования возбудителей гриппа и ОРВИ методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени на приборе «Rotor-Gene 6000» («Corbett Research») с использованием наборов реагентов: «АмплиСенс Influenza virus A/B-FL», «АмплиСенс Influenza virus A-тип-FL», «АмплиСенс Influenza virus A/H1-swine-FL», «АмплиСенс ОРВИ-скрин-FL» (ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия). Образцы, содержащие вирус гриппа, пересылали в ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России для молекулярно-генетического анализа. Было отобрано 87 образцов выделенных вирусов гриппа, из них вирус гриппа В — 53 образца, А(Н1N1)pdm09 — 18, А(Н3N2) — 16.

Секвенирование. Для секвенирования использовали ампликоны, полученные путем полногеномной амплификации по методу Жоу [13, 14]. Библиотеку для секвенирования нового поколения готовили с помощью набора реагентов «Nextera XT» («Illumina»). Нуклеотидные последовательности геномов вирусов гриппа А и В определяли на приборе «Illumina MiSeq» («Illumina»).

Филогенетический анализ проводили с помощью программы RAxML [15] с использованием TreeSub. Для построения филогенетических деревьев использовали метод максимального правдоподобия.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного пакета «Statistica 6». Для сравнения двух относительных показателей, характеризующих частоту определенного признака, рассчитывали критерий Фишера (ϕ); значение $p < 0,01$ считали статистически значимым. Для качественных параметров двух независимых групп рассчитывали критерий χ^2 ; значение $p < 0,05$ считали статистически значимым.

В Екатеринбурге за эпидемический сезон 2017–2018 гг. в эпидемический процесс гриппа и ОРВИ было вовлечено 27,0% населения. Общее количество госпитализированных пациентов с диагнозом «грипп» или ОРВИ составило 1,8% от числа зарегистрированных случаев заболеваний, наибольшее количество госпитализированных отмечено в возрастных группах 0–2 лет (3,8%) и старше 65 лет (2,1%).

В исследование было включено 5,6% госпитализированных пациентов в городе. Исследование продолжалось в течение 18 нед. (с 22.01.2018 г. по 27.05.2018 г.).

По результатам лабораторной диагностики больных с ТОРИ установлено, что 55,1% случаев были обусловлены вирусами гриппа и респираторными вирусами негриппозной этиологии, доля которых была практически одинакова (28,3 и 26,8% соответственно). Среди вирусов гриппа в анализируемом эпидемическом сезоне доминировали вирусы гриппа В линии Ямагата (46,5%) и высокопатогенный вирус гриппа А(Н1N1)pdm09 (20,2%). Доля вируса гриппа А(Н3N2) составила 10,5% (табл. 2). Среди респираторных вирусов преобладали респираторно-синцитиальные вирусы (26,0%), риновирусы (25,0%), метапневмовирусы (21,3%).

Среди детей доля лиц с инфекцией, обусловленной вирусами гриппа (66,5%), была достоверно выше по сравнению со взрослыми (29,7%) ($\phi = 7,39$, $p < 0,01$). Наибольшая доля вирусов гриппа была выделена в возрастных группах 0–2 и 3–6 лет (30,7 и 27,2% соответственно), наименьшая доля — среди подростков и лиц старше 65 лет — по 6,1%.

Доминирующий в анализируемом эпидемическом сезоне вирус гриппа В линии Ямагата выделялся от пациентов с ТОРИ всех возрастных групп,

Таблица 2. Этиологическая структура ТОРИ (Екатеринбург, эпидемический сезон 2017–2018 гг., %)
Table 2. The etiological structure of SARI (Yekaterinburg, epidemic season 2017–2018, %)

Возраст, лет Age, years	Грипп Influenza	Вирус Virus					Другие респираторные вирусы Other respiratory viruses	Вирус не выделен Not identified virus
		В Yam	A(H1N1) pdm09	A(H3N2)	A n/s	B n/s		
0–2	30,7	22,6	43,5	25,0	63,6	20,0	55,6	14,5
3–6	27,2	28,3	34,8	33,3	9,1	20,0	16,7	11,9
7–14	13,2	15,1	8,7	25,0	9,1	6,7	3,7	6,7
15–17	6,1	5,7	–	–	–	26,7	3,7	3,6
18–64	16,7	22,6	8,7	–	18,2	20,0	16,7	37,3
65 и старше 65 and older	6,1	5,7	4,3	16,7	–	6,7	3,7	19,7
Всего Total	28,3	46,5	20,2	10,5	9,6	13,2	26,8	47,9

однако наиболее часто — у детей младших возрастных групп (3–6 лет — 28,3%, 0–2 года — 22,6%), а также у взрослых 18–64 лет — 22,6%. Вирусы гриппа A(H1N1)pdm09 и A(H3N2) также выявляли преимущественно у детей 0–6 лет. Единичные случаи детекции этих вирусов отмечены среди подростков (15–17 лет) и лиц трудоспособного возраста (18–64 года). Для респираторных вирусов негриппозной этиологии были характерны те же тенденции.

В процессе исследования выявлены микст-инфекции, вызванные респираторными вирусами негриппозной этиологии. Все эти случаи были зарегистрированы в возрастной группе детей до 5 лет и обусловлены сочетаниями метапневмовируса и респираторно-синцитиальных вирусов (3 случая), риновирусов и респираторно-синцитиальных вирусов (2 случая).

Доля пациентов с ТОРИ, поступивших в отделения реанимации и интенсивной терапии, была невелика (7 пациентов), однако значительная часть этих случаев была обусловлена гриппозной инфекцией (5 пациентов). Среди выявленных вирусов идентифицированы вирусы гриппа A(H1N1)pdm09 (2 случая), гриппа В линии Ямагата (2 случая) и гриппа A(H3N2) (1 случай). Анамнез данных пациентов был отягощен наличием сопутствующих хронических заболеваний (в среднем — по 2 и более). У этих пациентов отмечено наличие заболеваний сердечно-сосудистой системы (7 случаев, 100%), сахарного диабета (4 случая, 57,1%), ХОБЛ (3 случая, 42,9%), новообразований (2 случая, 28,6%), бронхиальной астмы (1 случай, 14,3%), нарушений функции почек (1 случай, 14,3%), цирроза/заболевания печени (1 случай, 14,3%). Несмотря на наличие сопутствующих хронических заболеваний, указанные пациенты не были вакцинированы против гриппа в текущем эпидемическом сезоне.

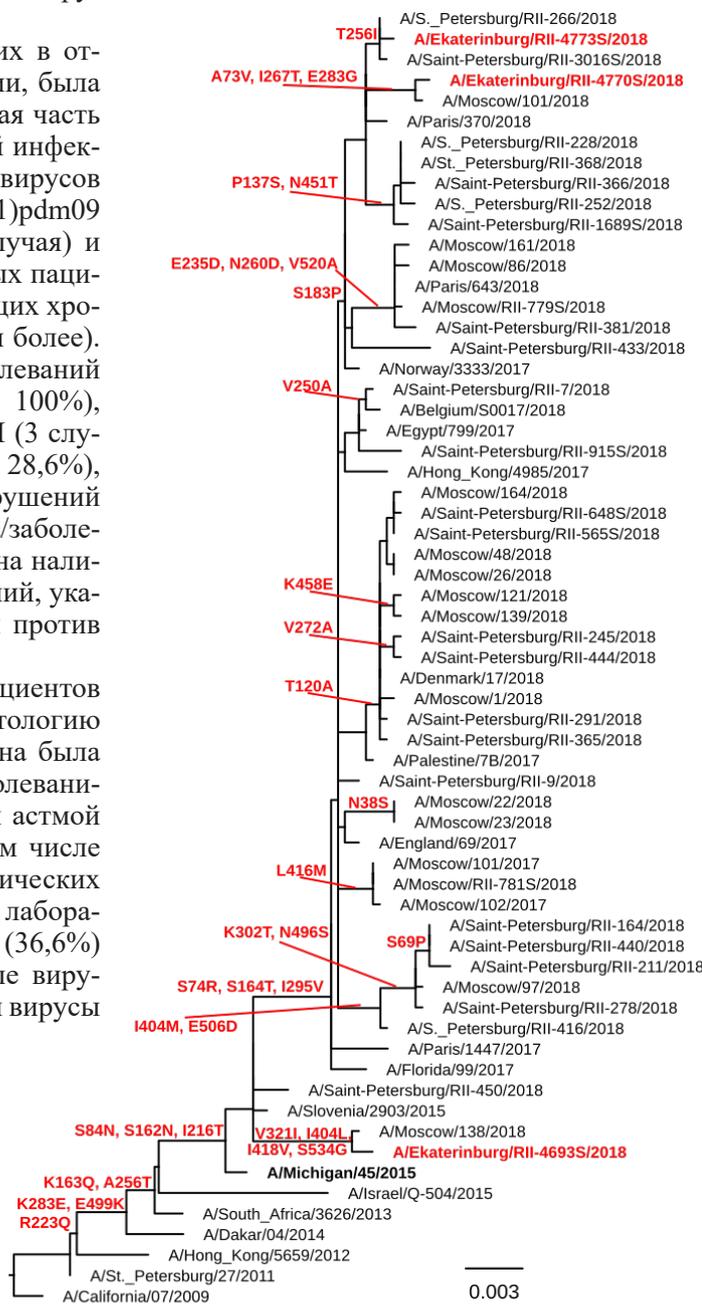
В данном исследовании среди всех пациентов с ТОРИ сопутствующую соматическую патологию имели 145 (36,1%) человек. В основном она была представлена сердечно-сосудистыми заболеваниями (31,4%), ХОБЛ (22,2%), бронхиальной астмой (11,8%) и сахарным диабетом (9,4%), в том числе 48 (33,1%) человек имели несколько хронических заболеваний одновременно. По результатам лабораторных исследований установлено, что у 53 (36,6%) заболевших были выявлены респираторные вирусы, значительную часть которых составляли вирусы

гриппа (32 случая; 60,4%). Это позволяет предположить наличие значимого влияния соматического состояния пациента на развитие ТОРИ, однако данный вопрос нуждается в дальнейшем изучении.

Пациентов, включенных в исследование, госпитализировали с различными заболеваниями верхних и нижних дыхательных путей. Наиболее часто (52,9%) был поставлен диагноз J06 (острые инфекции верхних дыхательных путей множественной и неуточненной локализации), с меньшей частотой — J18 (15,9%), J20.9 (12,7%), J44 (7,5%), J00 (5,5%), J45.8 (5,5%). Вирусы гриппа и респираторные вирусы достоверно чаще выделяли у больных ТОРИ с диагнозами «острая инфекция верхних дыхательных путей» (64,8%) и «острый бронхит» (17,6%).

Рис. 1. Филогенетическое дерево по гену гемагглютинина вируса гриппа А подтипа (H1N1)pdm09, построенное методом максимального правдоподобия

Fig. 1. The phylogenetic tree based on the hemagglutinin gene of influenza A virus subtype (H1N1) pdm09 built by the maximum likelihood method



6B.1

Среди пациентов с диагнозом «пневмония» доля лиц, у которых была установлена вирусная этиология заболевания, составила 10% ($p < 0,05$).

Вирусы гриппа и респираторные вирусы выявляли из биоматериала от больных ТОРИ на протяжении всего исследования, пик детекции зарегистрирован на 9–10-й неделе 2018 г. Длительность периода активной циркуляции вирусов гриппа в популяции зависела от их типа и варьировала от 5 до 14 нед.

Наиболее длительный период циркуляции отмечен у вируса гриппа А. Так, РНК вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 выявляли на протяжении 14 нед., пик приходился на 9-ю неделю 2018 г. Максимальная доля положительных находок РНК вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 составила 15% от общего количества обследованных в неделю. РНК вируса гриппа А(Н3N2) выделяли на протяжении лишь 5 нед., пик приходился на 13-ю неделю года, а максимальная доля положительных находок составила 9,3% от общего количества обследованных в неделю. Период циркуляции вируса гриппа В линии Ямагата по сравнению с периодом циркуляции вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 был менее длительным — 9 нед., пик регистрации приходился на 12-ю неделю, однако максимальная частота детекции вируса гриппа В была в 2 раза больше по сравнению с вирусом А(Н1N1)pdm09 и составила 31,7% от общего количества обследованных на неделе пика.

Среди респираторных вирусов наиболее активная циркуляция отмечена у респираторно-синцитиального вируса (период циркуляции составил

14 нед., пик выявляемости — 8–9-я неделя года), риновируса (период циркуляции 11 нед., пик выявляемости — 20-я неделя года) и метапневмовируса (период циркуляции 10 нед, пик выявляемости — 11-я неделя года). Вирусы парагриппа и аденовирусы, несмотря на длительную циркуляцию (12 нед., пик выявляемости — 10–11-я неделя года), не имели значимого распространения у пациентов с ТОРИ. Максимальная доля положительных находок составила 9,4% от общего количества обследованных в неделю. Коронавирус и бокавирус регистрировали в небольшом количестве в разные недели исследования.

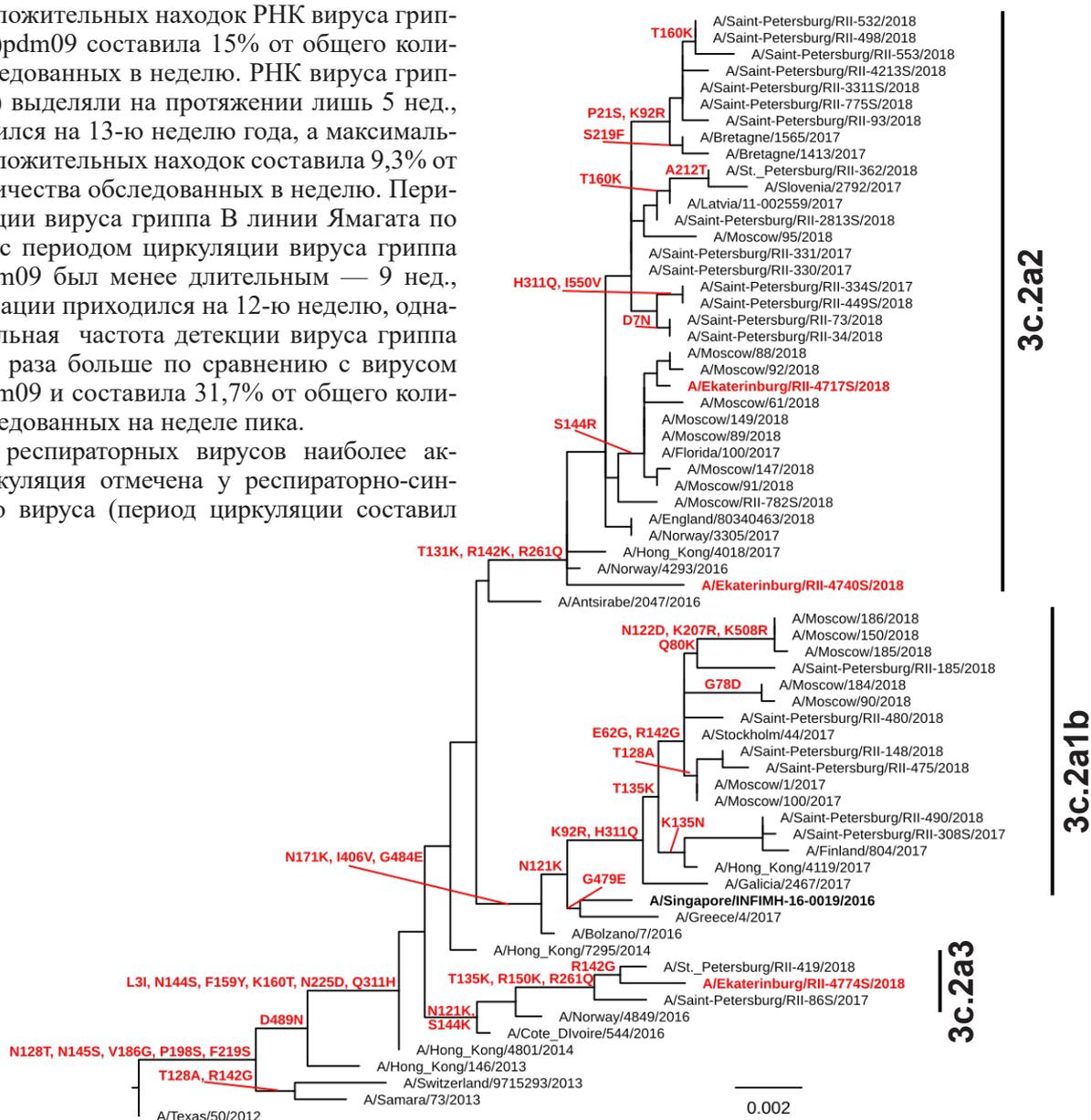


Рис. 2. Филогенетическое дерево по гену гемагглютинаина вируса гриппа А подтипа (H3N2), построенное методом максимального правдоподобия

Fig. 2. The phylogenetic tree based on the hemagglutinin gene of influenza A virus subtype (H3N2) built by the maximum likelihood method

Молекулярно-генетическая характеристика вирусов гриппа

Вирусы гриппа, исследованные молекулярно-генетическим методом, были выделены как от детей (68 образцов; 78,2%), так и от взрослых (19 образцов; 21,8%) с клиническими диагнозами:

- J06 — 68 человек (78,2%);
- J18 — 10 человек (11,5%);
- J20.9 — 6 человек (6,9%);
- J44 — 3 человека (3,4%).

Все исследованные вирусы гриппа A(H1N1)pdm09 принадлежали к клайду 6В.1, несли характерные аминокислотные замены в гемагглютинине S84N, S162N (с приобретением потенциального сайта гликозилирования) и I216T и были подобны вакцинному штамму A/Michigan/45/2015. По данным филогенетического анализа, большая часть исследованных вирусов формировала единый кластер, характеризующийся заменами в антигенных сайтах Сb (S74R, I295V) и Sa (S164T). Вместе с тем среди вирусов гриппа A(H1N1)pdm09, поступивших для исследования, был обнаружен вирус A/Ekaterinburg/RII-4693S/2018, содержащий замены V321I в первой субъединице гемагглютинина и I77L, I91V и S207G — во второй. Функциональное значение данных замен не известно. Следует отметить, что вирусы, образующие данную подгруппу на филогенетическом дереве по гену гемагглютинина, также группируются и по результатам анализа гена нейраминидазы (данные не приведены). В нейраминидазе этих вирусов обнаружена замена S70N, приводящая к потере потенциального сайта гликозилирования. Вирусы гриппа A/Ekaterinburg/RII-4770S/2018 и A/Ekaterinburg/RII-4773S/2018 относятся к генетическому кластеру с характерной заменой S183P в гемагглютинине, на долю которого пришлось около 33% исследованных российских вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 (рис. 1).

Вирусы гриппа A(H3N2), циркулировавшие в России в эпидемический сезон 2017–2018 гг. были представлены тремя генетическими клайдами: 3С.2а1В, 3С.2а2 и 3С.2а3 (рис. 2). Вирусы гриппа A(H3N2) из Екатеринбурга принадлежали к клайдам 3С.2а2 (A/Ekaterinburg/RII-4717S/2018, A/Ekaterinburg/RII-4740S/2018) и 3С.2а3 (A/Ekaterinburg/RII-4774S/2018). Представителей клайда 3С.2а1В, подобных рекомендованному вакцинному штамму A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016, среди вирусов

из Екатеринбурга не выявлено. Вирус клайда 3С.2а3 из Екатеринбурга, помимо стандартных аминокислотных замен N121K и S144K в антигенном сайте А, содержал дополнительный набор замен: T135K (с потерей потенциального сайта гликозилирования), R150K и R261Q.

Исследованные вирусы гриппа В относились к линии Ямагата, клайду 3. Вирус гриппа В/Ekaterinburg/RII-4723S/2018 отличался от референс-штамма В/Phuket/3073/2013 двумя аминокис-



Рис. 3. Филогенетическое дерево по гену гемагглютинина вируса гриппа В, построенное методом максимального правдоподобия

Fig. 3. The phylogenetic tree based on the hemagglutinin gene of influenza B virus built by the maximum likelihood method

лотными заменами в гене гемагглютинаина M251V и L172Q (рис. 3).

Несмотря на имеющиеся особенности, существенной связи между тяжестью заболевания пациентов и выделенными вирусами гриппа на данном этапе исследования не обнаружено.

Обсуждение

Изучение роли вирусов гриппа в развитии ТОРИ в Екатеринбурге в эпидемический сезон 2017–2018 гг. подтвердило их высокую клиническую значимость.

Так, по результатам исследования установлено, что в более чем половине случаев ТОРИ обусловлены вирусами, среди которых значительную долю составляют вирусы гриппа. Случаи ТОРИ чаще регистрировались среди детей младшей возрастной группы и были обусловлены вирусом гриппа В линии Ямагата и вирусом гриппа А(H1N1)pdm09. Наряду с вирусами гриппа у пациентов с ТОРИ достаточно часто выделяют и другие респираторные вирусы, такие как респираторно-синцитиальный вирус, риновирус и метапневмовирус, на что также указывают авторы аналогичных исследований [4, 10, 12].

Необходимо отметить, что 36,1% пациентов с ТОРИ имели сопутствующую соматическую патологию (сердечно-сосудистые заболевания, ХОБЛ, бронхиальная астма, сахарный диабет и др.). Частота детекции вирусов гриппа у них составила 60,4% от числа положительных результатов исследования. Однако наиболее значимое влияние вирусов гриппа на тяжесть клинического процесса респираторной инфекции отмечено среди пациентов отделения реанимации. Так, значительная часть случаев госпитализации пациентов с ТОРИ в отделение реанимации была обусловлена наличием у них гриппозной инфекции в сочетании с сопутствующей соматической патологией (сердечно-сосудистые заболевания, ХОБЛ, бронхиальная астма, новообразования, заболевания почек и печени). Отсутствие у пациентов с тяжелой соматической патологией вакцинации против гриппа в месяцы, предшествующие эпидемическому подъему заболеваемости гриппом, необходимо рассматривать как дополнительный фактор, влияющий на вероятность развития ТОРИ.

При анализе детекции вирусов гриппозной и негриппозной этиологии отмечено, что достоверно чаще вирусы определяли у больных ТОРИ с такими диагнозами, как острая инфекция верхних дыхательных путей и острый бронхит (64,8 и 17,6% соответственно), чем у пациентов с диагнозом «пневмония», у которых вирусы выделяли лишь в 10% случаев, что позволяет предположить более значимую роль бактериальных агентов в этиологии пневмоний.

По данным Национального центра по гриппу ВОЗ при ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Сморо-

динцева» Минздрава России, антигенный и генетический анализ вирусов гриппа А(H1N1)pdm09 и А(H3N2), циркулировавших в сезон 2017–2018 гг., показал, что все исследованные вирусы гриппа А по структуре поверхностных генов соответствовали штаммам, рекомендованным для включения в состав вакцин в сезон 2017–2018 гг. Вместе с тем во внутренних генах циркулирующих вирусов был обнаружен ряд замен, что соответствует данным, полученным в Екатеринбурге [7]. Ситуация по гриппу В была противоположной, поскольку в России доминировали вирусы гриппа В разновидности Ямагата, в то время как в вакцину был включен штамм В/Brisbane/60/2008 викторианской разновидности.

Благодарности

Авторы статьи выражают свою глубокую благодарность руководству и специалистам всех стационаров города Екатеринбурга, принявшим участие в выполнении научно-исследовательской работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Святченко С.В., Дурыманов А.Г., Суслопаров И.М., Колосова Н.П., Гончарова Н.И., Петрова О.В. и др. Тяжелые случаи заболевания гриппом на территории Российской Федерации в течение эпидемических сезонов 2015–2016 и 2016–2017. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2018; (1): 32-9.
DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-1-32-39>
2. Garten R.J., Davis C.T., Russell C.A., Shu B., Lindstrom S., Balish A., et al. Antigenic and genetic characteristics of the early isolates of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*. 2009, 325(5937): 197-201.
DOI: <http://doi.org/10.1126/science.1176225>
3. Tumpey T.M., Maines T.R., Van Hoeven N., Glaser L., Solórzano A., Pappas C., et al. A two-amino acid change in the hemagglutinin of the 1918 influenza virus abolishes transmission. *Science*. 2007; 315(5812): 655-9.
DOI: <http://doi.org/10.1126/science.1136212>
4. Wagner R., Matrosovich M., Klenk H.D. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Rev. Med. Virol.* 2002; 12(3): 159-66.
DOI: <http://doi.org/10.1002/rmv.352>
5. Woyessa A.B., Mengesha M., Belay D., Tayachew A., Ayele W., Beyene B., et al. Epidemiology of influenza in Ethiopia: findings from influenza sentinel surveillance and respiratory infection outbreak investigations, 2009–2015. *BMC Infect. Dis.* 2018; 18(1): 449.
DOI: <http://doi.org/10.1186/s12879-018-3365-5>
6. Брико Н.И., Салтыкова Т.С., Герасимов А.Н., Суранова Т.Г., Поздняков А.А., Жигарловский Б.А. Клинико-эпидемиологическая характеристика гриппа в 2015–2016 и 2016–2017 гг. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2017; (4): 4-13.
7. Canela L.N.P., Magalhães-Barbosa M.C., Raymundo C.E., Carneiro S., Siqueira M.M., Prata-Barbosa A., et al. Viral detection profile in children with severe acute respiratory infection. *Braz. J. Infect. Dis.* 2018; 22(5): 402-11.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.bjid.2018.09.001>
8. Соминина А.А., Смородинцева Е.А., Столяров К.А., Мельникова А.А. Совершенствование системы надзора за гриппом в Российской Федерации: основные результаты сигнального надзора за гриппом и другими острыми рес-

- пираторными вирусными инфекциями. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2017; 16(2): 7-15.
- Choi S.H., Hong S.B., Ko G.B., Lee Y., Park H.J., Park S.Y., et al. Viral infection in patients with severe pneumonia requiring intensive care unit admission. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012; 186(4): 325-32.
DOI: <http://doi.org/10.1164/rccm.201112-2240OC>
 - Meerhoff T.J., Simaku A., Ulqinaku D., Torosyan L., Gribkova N., Shimanovich V., et al. Surveillance for severe acute respiratory infections (SARI) in hospitals in the WHO European region — an exploratory analysis of risk factors for a severe outcome in influenza-positive SARI cases. *BMC Infect. Dis.* 2015; 15: 1.
DOI: <http://doi.org/10.1186/s12879-014-0722-x>
 - Mjid M., Cherif J., Toujani S., Mokkaedem S., Saada I., Ben Salah N., et al. Infuenzae A (H1N1): about 189 cases. *Tunis Med.* 2014; 92(12): 748-51. (in French)
 - Руководство Европейского регионального бюро ВОЗ по дозорному эпиднадзору за гриппом среди людей. 2011. Available at: http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0003/90444/e92738R.pdf
 - Zhou B., Wentworth D.E. Influenza A virus molecular virology techniques. In: Kawaoka Y., Neumann G., eds. *Influenza Virus. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols). Volume 865*. Clifton: Humana Press; 2012.
 - Zhou B., Lin X., Wang W., Halpin R.A., Bera J., Stockwell T.B., et al. Universal influenza B virus genomic amplification facilitates sequencing, diagnostics, and reverse genetics. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52(5): 1330-7.
DOI: <http://doi.org/10.1128/JCM.03265-13>
 - Stamatakis A. RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics.* 2006; 22(21): 2688-90.
DOI: <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl446>
- infections. *Rev. Med. Virol.* 2002; 12(3): 159-66.
DOI: <http://doi.org/10.1002/rmv.352>
- Woyessa A.B., Mengesha M., Belay D., Tayachew A., Ayele W., Beyene B., et al. Epidemiology of influenza in Ethiopia: findings from influenza sentinel surveillance and respiratory infection outbreak investigations, 2009-2015. *BMC Infect. Dis.* 2018; 18(1): 449.
DOI: <http://doi.org/10.1186/s12879-018-3365-5>
 - Briko N.I., Saltykova T.S., Gerasimov A.N., Suranova T.G., Pozdnyakov A.A., Zhigarlovskiy B.A. Clinical and epidemiological characteristics of influenza in 2015–2016 and 2016–2017. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy.* 2017; (4): 4-13. (in Russian)
 - Canela L.N.P., Magalhães-Barbosa M.C., Raymundo C.E., Carney S., Siqueira M.M., Prata-Barbosa A., et al. Viral detection profile in children with severe acute respiratory infection. *Braz. J. Infect. Dis.* 2018; 22(5): 402-11.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.bjid.2018.09.001>
 - Sominina A.A., Smorodinceva E.A., Stolyarov K.A., Mel'nikova A.A. Enhancement of the influenza surveillance system in the Russian Federation: the main results of the sentinel surveillance for influenza and other acute respiratory viral infections. *Epidemiologiya i vakcinoprofilaktika.* 2017, 1(92): 7-15. (in Russian)
 - Choi S.H., Hong S.B., Ko G.B., Lee Y., Park H.J., Park S.Y., et al. Viral infection in patients with severe pneumonia requiring intensive care unit admission. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012; 186(4): 325-32.
DOI: <http://doi.org/10.1164/rccm.201112-2240OC>
 - Meerhoff T.J., Simaku A., Ulqinaku D., Torosyan L., Gribkova N., Shimanovich V., et al. Surveillance for severe acute respiratory infections (SARI) in hospitals in the WHO European region — an exploratory analysis of risk factors for a severe outcome in influenza-positive SARI cases. *BMC Infect. Dis.* 2015; 15: 1.
DOI: <http://doi.org/10.1186/s12879-014-0722-x>
 - Mjid M., Cherif J., Toujani S., Mokkaedem S., Saada I., Ben Salah N., et al. Infuenzae A (H1N1): about 189 cases. *Tunis Med.* 2014; 92(12): 748-51. (in French)
 - WHO. Europe Regional Office. Human Influenza Sentinel Guide. 2011.
Available at: http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0003/90444/e92738R.pdf (in Russian)
 - Zhou B., Wentworth D.E. Influenza A virus molecular virology techniques. In: Kawaoka Y., Neumann G., eds. *Influenza Virus. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols). Vol. 865*. Clifton: Humana Press; 2012.
 - Zhou B., Lin X., Wang W., Halpin R.A., Bera J., Stockwell T.B., et al. Universal influenza B virus genomic amplification facilitates sequencing, diagnostics, and reverse genetics. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52(5): 1330-7.
DOI: <http://doi.org/10.1128/JCM.03265-13>
 - Stamatakis A. RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics.* 2006; 22(21): 2688-90.
DOI: <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl446>

REFERENCES

- Svyatchenko C.B., Durymanov A.G., Susloparov I.M., Kolesova N.P., Goncharova N.I., Petrova O.V., et al. Severe cases of seasonal influenza in Russia in 2015–2016 and 2016–2017. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2018; (1): 32-9.
DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-1-32-39> (in Russian)
- Garten R.J., Davis C.T., Russell C.A., Shu B., Lindstrom S., Balish A., et al. Antigenic and genetic characteristics of the early isolates of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science.* 2009, 325(5937): 197-201.
DOI: <http://doi.org/10.1126/science.1176225>
- Tumpey T.M., Maines T.R., Van Hoeven N., Glaser L., Solórzano A., Pappas C., et al. A two-amino acid change in the hemagglutinin of the 1918 influenza virus abolishes transmission. *Science.* 2007; 315(5812): 655-9.
DOI: <http://doi.org/10.1126/science.1136212>
- Wagner R., Matrosovich M., Klenk H.D. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus

Информация об авторах:

Алимов Александр Викторович — к.м.н., руководитель ЕНИИВИ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, 620030, Екатеринбург, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0511-9409>.
E-mail: virus@eniivi.ru

Смирнова Светлана Сергеевна — к.м.н., рук. Урало-Сибирского научно-методического центра по профилактике

Information about the authors:

Aleksandr V. Alimov — PhD (Med.), Head, Yekaterinburg Research Institute of Viral Infections, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», 620030, Yekaterinburg, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0511-9409>.
E-mail: virus@eniivi.ru

Svetlana S. Smirnova — PhD (Med.), Head, Ural-Siberian Scientific and Methodological Center for the Prevention of Infections Associated with the Provision of Medical Assistance, Yekaterinburg

инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, ЕНИИВИ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, 620030, Екатеринбург; доц. каф. эпидемиологии ФГБОУ ВО УГМУ, 620028, Екатеринбург, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9749-4611>. E-mail: virus@eniivi.ru

Леленкова Евгения Викторовна[✉] — врач-эпидемиолог, ЕНИИВИ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, 620030, Екатеринбург, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2004-0977>. E-mail: lelenkova_ev@eniivi.ru

Маркарян Александр Юрьевич — к.б.н., с.н.с. лаб. респираторных вирусных инфекций ЕНИИВИ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, 620030, Екатеринбург, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7286-6079>. E-mail: virus@eniivi.ru

Вялых Иван Владимирович — к.в.н., зав. лаб. трансмиссивных вирусных инфекций ЕНИИВИ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, 620030, Екатеринбург, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3123-8359>. E-mail: virus@eniivi.ru

Веревищikov Владислав Константинович — к.м.н., доц. каф. инфекционных болезней и клинической иммунологии ФГБОУ ВО УГМУ, 620028, Екатеринбург, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6039-6500>

Комиссаров Андрей Борисович — зав. лаб. молекулярной вирусологии ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева», 197376, Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1733-1255>. E-mail: andrey.komissarov@influenza.spb.ru

Соминина Анна Адольфовна — д.м.н., проф., зав. лаб. изучения факторов риска при гриппе и ОРВИ ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева», 197376, Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9671-0629>. E-mail: anna.sominina@influenza.spb.ru

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Research Institute of Viral Infections, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», 620030, Yekaterinburg, Russia; Assoc. Prof., Department of epidemiology, Ural State Medical University, 620028, Yekaterinburg, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9749-4611>. E-mail: virus@eniivi.ru

Evgenia V. Lelenkova[✉] — epidemiologist, Yekaterinburg Research Institute of Viral Infections, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», 620030, Yekaterinburg, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2004-0977>. E-mail: lelenkova_ev@eniivi.ru

Aleksandr Yu. Markaryan — Ph.D., senior researcher, Laboratory of respiratory viral infections, Yekaterinburg Research Institute of Viral Infections, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», 620030, Yekaterinburg, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7286-6079>. E-mail: virus@eniivi.ru

Ivan V. Vyalykh — PhD (Vet.), Head, Laboratory of transmissible viral infections, Yekaterinburg Research Institute of Viral Infections, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», 620030, Yekaterinburg, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3123-8359>. E-mail: virus@eniivi.ru

Vladislav K. Verevshchikov — PhD (Med.), Assoc. Prof., Department of Infectious diseases and clinical immunology, Ural State Medical University, 620028, Yekaterinburg, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6039-6500>

Andrey B. Komissarov — Head, Laboratory of molecular virology, Smorodintsev Research Institute of Influenza, 197376, Saint-Petersburg, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1733-1255>. E-mail: andrey.komissarov@influenza.spb.ru

Anna A. Sominina — D. Sci. (Med.), Prof., Head, Laboratory of studying of risk factors for influenza and acute respiratory viral infections, Smorodintsev Research Institute of Influenza, 197376, Saint-Petersburg, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9671-0629>. E-mail: anna.sominina@influenza.spb.ru

Contribution: the authors contributed equally to this article.

ОБЗОРЫ

© Леонова Г.Н., 2020



Клещевой энцефалит в Дальневосточном очаговом регионе евразийского континента

Леонова Г.Н.[✉]

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова»,
690087, Владивосток, Россия

Проведен анализ активности природных очагов клещевого энцефалита (КЭ) в Дальневосточном федеральном округе (Приморском и Хабаровском краях, Еврейской автономной и Амурской областях), представленного единым Сихотэ-Алиньским очаговым регионом. К нему примыкают эндемичные территории Китая, Кореи, Японии. В последнее десятилетие, по сравнению с 1990-ми гг., произошло снижение показателей инфицированности иксодовых клещей и заболеваемости КЭ. Часто показатели зараженности иксодовых клещей по данным иммуноферментного анализа, полимеразной цепной реакции и изоляции вируса КЭ (ВКЭ) не совпадали. Активная циркуляция ВКЭ с участием доминирующих и дополнительных видов иксодовых клещей и мышевидных грызунов стала известна с 1952 г. в Китае, с 1990-х гг. — в Японии и с 2011 г. — в Южной Корее. На всех территориях определена циркуляция штаммов ВКЭ дальневосточного субтипа. Исключение составили 7 изолятов, выделенные в Южной Корее, которые по молекулярно-генетической характеристике оказались штаммами европейского субтипа. В 2017 г. стало известно об изоляции двух новых штаммов ВКЭ из органов диких грызунов *Marmota himalayana* на территориях ранее неизвестных природных очагов на Тянь-Шане (Китай). Молекулярно-генетические отличия этих изолятов от штаммов ВКЭ трех субтипов позволили констатировать появление нового гималайского субтипа ВКЭ (Him-TBEV), который, по мнению авторов, был «скрыт» в течение сотен лет. Можно также сделать предположение о процессах видообразования новых субтипов ВКЭ. Наиболее полное представление о дальневосточной популяции ВКЭ получено в последнее десятилетие XX в., что явилось основой и толчком для изучения и сравнительного анализа многочисленных штаммов ВКЭ, выделенных на территории евразийского континента.

Ключевые слова: клещевой энцефалит; заболеваемость; диагностика вируса; распространенность; восток евразийского континента.

Источник финансирования. Работа поддержана научным проектом (№ 0545-2019-0007) ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова».

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

Для цитирования: Леонова Г.Н. Клещевой энцефалит в Дальневосточном очаговом регионе евразийского континента. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2020; 97(2): 150–158.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-150-158>

Поступила 05.11.2019

Принята в печать 12.01.2020

Tick-borne Encephalitis in the Far East Focal Region of the Eurasian Continent

Galina N. Leonova[✉]

Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, 690087, Vladivostok, Russia

The analysis of the activity of natural foci of tick-borne encephalitis (TBE) in the Far Eastern Federal District (Primorsky and Khabarovsk Territories, the Jewish Autonomous and Amur Regions), represented by a single Sikhote-Alin focal region was performed. Endemic territories of China, Korea, Japan are adjacent to this focal region. In the last decade the decrease of the infection rate in ixodid ticks and the morbidity of TBE compared to the 1990s was observed. Data on the infection rates in ixodid ticks based on ELISA, PCR and TBEV isolation

are often discrepant. Active circulation of TBEV that involved dominant and less significant species of ixodid ticks and mouse-like rodents has been demonstrated since 1952 in China, since the 1990s in Japan and since 2011 in South Korea. The circulation of TBEV strains of the Far Eastern subtype was determined in all these territories. The exception was 7 strains isolated in South Korea, which appeared to be the European subtype based on the results of molecular genetic analysis. Two new strains of TBEV from the organs of wild rodents *Marmota himalayana* were isolated in 2017 in the territories of previously unknown natural foci in the Tien Shan, China. The genetic divergence of these strains from three TBEV subtypes allowed us to establish the existence of a new Himalayan TBEV subtype (Him-TBEV), which, according to the authors, has been "hidden" for hundreds of years. One can also speculate the processes of emergence of new TBEV subtypes. The most complete picture of the Far Eastern population of TBEV was obtained in the last decade of the twentieth century, which served as the basis and impetus for the study and comparative analysis of the differences in numerous strains of TBEV isolated on the territory of the Eurasian continent.

Keywords: tick-borne encephalitis; morbidity; virus diagnosis; prevalence; east of the Eurasian continent.

Acknowledgments. This work was supported by a scientific project (No. 0545-2019-0007) of the Somov Institute of Epidemiology and Microbiology.

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

For citation: Leonova G.N. Tick-borne Encephalitis in the Far East Focal Region of the Eurasian Continent. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(2): 150–158. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-150-158>

Received 5 November 2019
Accepted 12 January 2020

Введение

Дальний Восток является территорией, где впервые в 1937 г. был открыт клещевой энцефалит (КЭ) [1]. Вслед за этим выделение вируса КЭ (ВКЭ) и описание клинических проявлений болезни человека быстро сформировало представление о важности этой проблемы. В настоящее время клещевой вирусный энцефалит считается широко распространенной инфекцией на евразийском континенте и является для здравоохранения одной из актуальных проблем [2, 3].

Основная часть

В Дальневосточном федеральном округе РФ очаги КЭ находятся на территориях Приморского и Хабаровского краев, Еврейской автономной и Амурской областей, представляя единый Сихотэ-Алиньский очаговый регион согласно районированию ареала КЭ [4]. Учитывая биохорологическую структуру ареала таежного клеща, Э.И. Коренберг подразделил этот регион на Северо-Сихотэ-Алиньский, ограниченный реками Амур и Бикин, и Южно-Сихотэ-Алиньский [5, 6]. На западе к нему примыкает очаговый регион Малого Хингана и Восточно-Маньчжурских гор, обозначенный в Китае как северо-восточные эндемичные районы (Внутренняя Монголия, Хэйлунцзян и Цзилинь) [7]. Всю эту территорию занимают горные широколиственные, кедрово-широколиственные и горно-таежные темнохвойные леса Сихотэ-Алиньского очагового региона и северо-востока Китая. В последнее десятилетие на другой территории, примыкающей к южным границам Приморского края (Корейский полуостров) и восточным границам Китая, также возникла необходимость изуче-

ния КЭ. Здесь к настоящему времени случаев заболевания не зарегистрировано, но известны данные по изоляции от мелких млекопитающих 7 штаммов ВКЭ [8]. Кроме того, к Курильской гряде и о. Сахалин примыкает эндемичная по КЭ территория о. Хоккайдо, Япония [9].

Для понимания процессов изменчивости возбудителей природно-очаговых болезней природный очаг следует рассматривать как систему или как биогеоценоз, в котором длительное время без заноса извне возбудитель инфекции может циркулировать самостоятельно [10]. Для ВКЭ систему биогеоценоза составляют главным образом переносчики вируса — иксодовые клещи — и их прокормители — млекопитающие. На территории всех ландшафтов Дальневосточного региона доминирующими видами мышевидных грызунов, основных прокормителей личиночной и нимфальной стадий иксодовых клещей, являются: восточноазиатская мышь (*Apodemus peninsulae*, Thomas, 1906), красно-серая полевка (*Myodes rufocanus*), красная полевка (*Myodes rutilus*), а также полевая мышь (*Apodemus agrarius*, Pallas, 1971).

На территории Сихотэ-Алиньского очагового региона выявлено 22 вида клещей семейства *Ixodidae*. К числу основных переносчиков вируса относятся следующие виды иксодовых клещей: *Ixodes persulcatus* P. Sch., *Haemaphysalis japonica douglasi* Nut. et Warb., *Haemaphysalis concinna* Koch, *Dermacentor silvarum* Ol., *Ixodes nipponensis* Kitt. et Saito, *Ixodes pavlovskyi* B. Pom., *Haemaphysalis longicornis* и др. [11, 12]. В северо-восточных эндемичных районах Китая с помощью молекулярных методов классифицированы 5 видов эндемичных иксодовых клещей. Здесь, помимо основного векто-

ра *I. persulcatus*, ВКЭ может переноситься клещами *Dermacentor silvarum*, *Haemaphysalis concinna* и *Haemaphysalis japonica* [7], а также *Haemaphysalis longicornis* [13]. На о. Сахалин зарегистрированы 3 вида иксодовых клещей (*I. persulcatus*, *H. concinna* и *I. angustus Neumann*), собранных с диких мелких млекопитающих [12]. В Южной Корее как потенциальные переносчики ВКЭ рассматриваются нехарактерные векторы ВКЭ — клещи *H. longicornis*, *H. flava*, *H. japonica* и *I. nipponensis* [8]. В природных очагах о. Хоккайдо основным переносчиком ВКЭ является клещ *Ixodes ovatus*, а его прокормителями — *Clethrionomys rufocanus* и *Apodemus speciosus* [14, 15], а также сторожевые собаки, из которых были выделены первые штаммы ВКЭ в Японии [9].

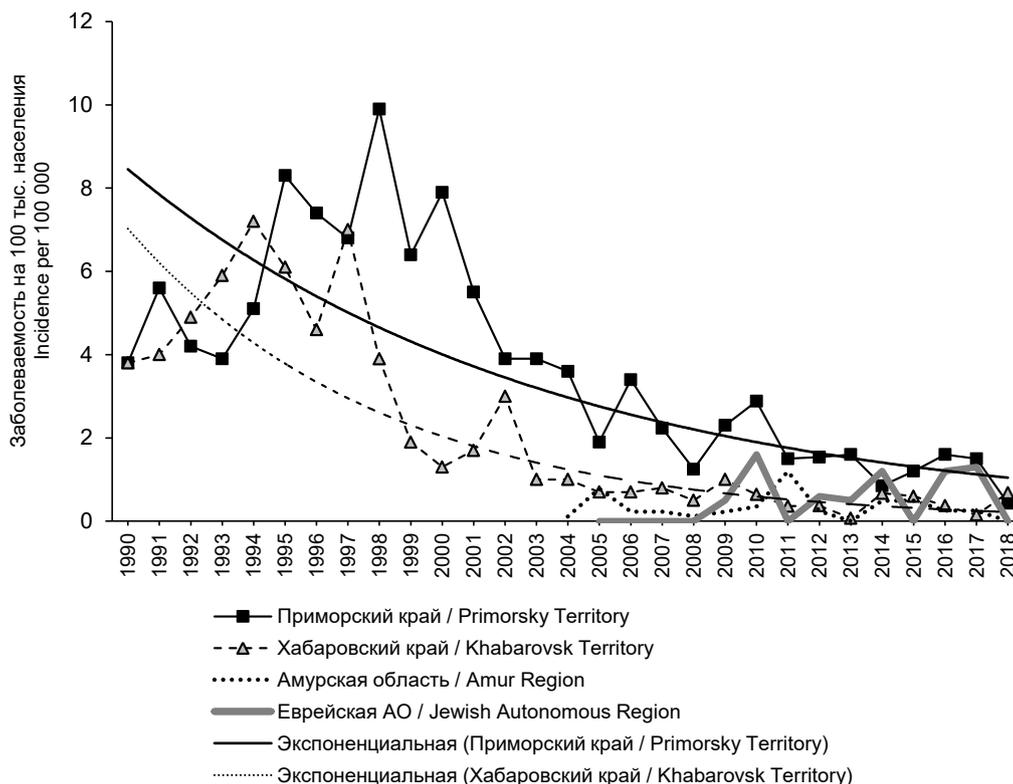
Динамика численности иксодовых клещей и мелких грызунов колеблется по годам, влияя на активность вирусной популяции [10, 16], что отражается и на показателях заболеваемости КЭ.

На протяжении 1990–2018 гг. на территории Южно-Сихотэ-Алиньского региона (Приморский край) заболеваемость КЭ всегда была выше по сравнению с территориями Северо-Сихотэ-Алиня (рисунок). Здесь наблюдается главная тенденция — динамичное снижение показателей заболеваемости КЭ (экспоненциальная динамика), которая характеризует идентичность эпизоотических процессов в

функционирующих природных очагах на всех территориях Сихотэ-Алиньского региона.

Сложилось стойкое представление о том, что классическая форма дальневосточного КЭ характеризуется особой тяжестью инфекционного процесса с высокими показателями неблагоприятных исходов [17–19]. Подобная картина наблюдается на территории прилегающего Китая. Официально КЭ был зарегистрирован в провинции Хэйлунцзян еще в 1952 г., тогда заболеваемость в этой провинции составляла 3,2 на 100 тыс. населения, а летальность достигала более 25%. Регистрировали регулярные подъемы заболеваемости с пиками каждые 5–7 лет [20]. Хотя до 1994 г. большинство случаев были зарегистрированы на территории провинции Муданьцзян (реки Сунгари и Ичунь), в дальнейшем очаги КЭ распространились до городов Цзиси и Харбин [20, 21].

В 1990–1999 гг. на всей очаговой территории евразийского континента наступило ухудшение эпидемической ситуации по КЭ. Отмечено многократное увеличение показателей заболеваемости не только на территориях Западной и Восточной Сибири, но и в европейских областях и странах [3]. Дальневосточный регион не стал исключением, заболеваемость КЭ в нем достигла самых высоких показателей (рисунок). В этот период уровень забо-



Динамика заболеваемости клещевым энцефалитом на разных административных территориях Дальневосточного региона Российской Федерации в 1990–2018 гг.

The dynamics of the tick-borne encephalitis incidence in different administrative territories of the Far Eastern region of the Russian Federation from 1990 to 2018.

леваемости КЭ в Приморском крае был выше, чем в других регионах Дальнего Востока, — 3,80–9,88 на 100 тыс. населения. Средний показатель летальности составил 15,3%. Ухудшение эпидемической ситуации по КЭ и другим инфекционным заболеваниям на всех эндемичных территориях РФ многие исследователи связывали не только с общебиологическими закономерностями регуляции эпидемического процесса, но и с социальными факторами. Население, не занятое постоянной трудовой деятельностью, при низком уровне прожиточного обеспечения до настоящего времени представляет собой группу повышенного риска заражения возбудителями клещевых инфекций [22–24].

В 2000–2009 гг., напротив, сложилась стойкая тенденция выраженного снижения уровня заболеваемости КЭ, причем наименьшее значение его было отмечено в 2008 г. — 1,25 на 100 тыс. населения. Но средний показатель заболеваемости ($3,8 \pm 2,0$ на 100 тыс. населения) оставался выше общероссийского ($3,1$ на 100 тыс. населения). Показатель летальности также снизился — до 10,5%.

В 2010–2018 гг. снижение заболеваемости КЭ продолжилось. Так, в 2014 и 2018 гг. отмечены крайне низкие показатели заболеваемости (0,85 и 0,43 на 100 тыс. населения), показатели летальности были также низкими — от 3,4% в 2012 и 2013 гг. до 0% в 2015 г. [22]. Подобная динамика заболеваемости КЭ наблюдалась в соседних северных провинциях Китая — повышенные показатели заболеваемости отмечались в 2009–2011 гг. и снижались в последующие эпидемические сезоны. Причем летальность при КЭ была также низкой и составляла 0,9% [25].

В среднем за весь 80-летний период изучения КЭ показатель летальности в Приморском крае составил 17% [26], в Хабаровском крае — до 10,9% [27].

Кроме того, характерным для этих лет явилось снижение показателей зараженности иксодовых клещей на всей территории природных очагов Сихотэ-Алиньского региона. Следует отметить, что если в 1990–2010 гг. основным методом верификации ВКЭ был иммуноферментный анализ (ИФА), то в последнее десятилетие в лабораторную диагностику прочно внедрились методы молекулярной диагностики (ОТ-ПЦР). Оба эти метода являются основными в плане изучения вирусофорности иксодовых клещей, а также диагностики КЭ.

За 2007–2016 гг. наблюдения, используя ИФА, А.Г. Драгомерецкая с соавт. [28] показали динамику выявления антигена ВКЭ в клещах после присасывания их к человеку в Хабаровском крае. Процент этих показателей не всегда был синхронным относительно уровня заболеваемости КЭ. Так, в 2007 г. отмечен пиковый показатель ($9,4 \pm 1,13\%$), после которого происходило значительное снижение вирусофорности клещей (в 2008 г. — 3,1%, в

2009 г. — 2,4%, в 2010 г. — 1,01%, в 2011 г. — 0,8%, в 2012 г. — 1,2%, в 2013 г. — 3,6%). Следующий подъем вирусофорности клещей отмечен в 2014 г. ($10,3 \pm 0,72\%$), а снижение — в 2016 г. до $5,9 \pm 0,45\%$. Однако общая зараженность клещей, собранных в этот же период в лесных биотопах и исследованных с помощью ОТ-ПЦР, составила всего лишь 1,3%. В то же время распределение генетического маркера ВКЭ у взрослых клещей разных видов, собранных в 1999–2014 гг., показало, что средний уровень вирусофорности клещей *I. persulcatus* составил $7,9 \pm 0,7\%$, *H. concinna* — $5,6 \pm 1,0\%$, *H. japonica* — $2,0 \pm 2,0\%$ и *D. silvarum* — $1,3 \pm 1,3\%$ [29].

В 2008–2018 гг. в Приморском крае с помощью ИФА были проведены исследования по определению антигена в клещах, присосавшихся к людям, а в случаях потери клеща антиген ВКЭ выявляли в лейкоцитарной фракции крови пациентов [22, 30]. Всего исследовано 6754 пробы крови и 14 084 экземпляра иксодовых клещей. Причем ежегодно антиген ВКЭ почти в 3 раза чаще выявляли в крови людей с укусом клеща ($4,6 \pm 0,83\%$) по сравнению с показателями антигена в клещах, снятых с людей ($1,1 \pm 0,09\%$). Частично пробы, положительные в ИФА (944 клещей и 146 проб крови), исследовали методом ОТ-ПЦР-РВ. РНК ВКЭ выявили в клещах в 9 случаях (0,95%), однако изолировать вирус из этих проб не удалось. Только в 2018 г. антиген ВКЭ был выявлен в 0,6% клещей *I. persulcatus* и не обнаружен в других приморских клещах *Dermacentor* и *Haemaphysalis*. При исследовании методом ОТ-ПЦР-РВ в клещах *I. persulcatus* генетический маркер вируса КЭ определяли в 0,65–0,9% случаев [30, 31]. Так же редко, в 1,1% случаев, РНК ВКЭ обнаруживали в клещах, собранных с растительности [32].

И все же из антигенположительных лейкоцитарных фракций крови людей нам удалось выделить 3 штамма ВКЭ, которые были изолированы в период наибольшей активности вируса в 2009 и 2010 гг., когда заболеваемость составляла 2,3 и 2,88 на 100 тыс. населения, а летальность была равна 15,9 и 7,3% соответственно [22].

Многие исследователи при проведении диагностики КЭ зачастую сталкиваются с несовпадением положительных результатов в ИФА и ПЦР [22, 31, 33]. Кроме того, выявленные положительные пробы в клещах и лейкоцитарной фракции крови людей в ИФА или в ПЦР довольно часто не подтверждаются изоляцией ВКЭ. Так, по данным О.В. Мельниковой и соавт. [33], большая часть суспензий, содержащих антиген ВКЭ, не вызывала клинических проявлений болезни при заражении ими белых мышей. Авторам удалось выделить вирус из клещевых суспензий в 25% наблюдений, из мозговых суспензий мелких млекопитающих — в 10,5%. Причиной того является формирование незрелых, т.е. неинфекци-

онных вирусных частиц, которые могут выявляться или в ИФА, или в ПЦР.

Расхождение выявления положительных показателей, полученных в ПЦР, по сравнению с ИФА, было отмечено нами [34] для слабопатогенного штамма *Primorye-437* в диапазоне титра ВКЭ, равного $1 \log \text{TCID}_{50}/\text{мл}$, для высокопатогенного штамма *Dal'negorsk* — $5 \log \text{TCID}_{50}/\text{мл}$. Эффективность выявления генетического маркера в ПЦР по сравнению с ИФА для невирулентного штамма, имеющего дефекты в генетической структуре [44], была выше в 10 раз, а для высокопатогенного штамма — в 5000 и более раз [34]. Замены аминокислот в неструктурных вирусных белках, таких как протеаза (комплекс белков NS2B/NS3) и РНК-полимераза, могут влиять на активность ферментов и скорость размножения ВКЭ [44]. Поэтому верификация в ПЦР штаммов ВКЭ с разной биологической характеристикой может происходить по-разному.

Для изучения генетической характеристики возбудителей стали широко использовать не штаммы ВКЭ, а изоляты РНК, выделенные из различных объектов [35]. Получение молекулярно-генетической характеристики изолятов путем секвенирования РНК, выделенной непосредственно из биологических образцов, представляет ценность в плане исключения изменчивости вирусного генома при пассировании штамма на культуре клеток или на лабораторных животных [35]. Однако при наличии в вирусном геноме мутаций в участках связывания праймеров или зондов, входящих в состав ПЦР-теста, такой штамм может определяться данным тестом с меньшей вероятностью: не все геноварианты возбудителей выявляются, и всегда существует вероятность получения ложноотрицательных результатов [36]. При таком подходе к детекции вируса проведение расширенных молекулярно-генетических исследований ограничено, а без выделенного штамма невозможно изучать биологические основы патогенности возбудителя, что необходимо для понимания эпидемиологии, клиники и разработки методов лечения и профилактики болезни. Несомненно, что только одновременное сочетание положительных показателей в двух реакциях (ИФА и ПЦР) может способствовать выявлению полноценного ВКЭ в достаточной концентрации для активной репликации [34].

Анализируя особенности проявления КЭ в Приморском и Хабаровском краях, следует отметить, что здесь, наряду с крайне тяжелыми формами заболевания, ведущими к летальным исходам, в последние годы все чаще стали встречаться случаи КЭ со стертыми и бессимптомными формами инфекции [18, 22, 27]. Результаты положительных проб присосавшихся клещей или крови людей с укусами клещей чаще всего указывают лишь на присутствие генетического маркера РНК в ПЦР или

антигена вируса в ИФА. Это может свидетельствовать о получении реципиентом субпороговой дозы возбудителя, недостаточной для развития активного инфекционного процесса [37].

Зараженность проб полноценным вирусом, способным к репликации, можно выявить только при помощи классических вирусологических способов изоляции возбудителя. Такой полноценный вирус способен вызывать разнообразные клинические проявления инфекции — от легких лихорадочных до тяжелых очаговых форм КЭ с летальными исходами [22].

Выделение полноценного инфекционного вируса, опасного для человека, не только решает эпидемиологические задачи, но и открывает перспективы изучения его биологических свойств и молекулярно-генетической характеристики. Такая возможность, как правило, предоставляется в годы активной циркуляции вируса в природном очаге, когда появляются штаммы с повышенной вирулентностью. Так, в 2004 г. при подъеме заболеваемости КЭ (3,6 на 100 тыс. населения) на севере Приморского края из мозга умершего пациента был выделен новый вариант высоковирулентного штамма ВКЭ [38]. Или, например, в провинции Муданьцзян в Китае в 2010 г. при повышенной заболеваемости были изолированы 2 штамма ВКЭ (MDJ-02 и MDJ-03) из крови тяжелобольных пациентов [39]. Изучение молекулярно-генетической характеристики показало близкое родство этих штаммов к двум представителям вируса дальневосточного субтипа: к штамму VL99-m11, изолированному в Приморском крае (Ботанический сад Владивостока), и к штамму KN99-m9 в Хабаровском крае [40].

В 1993 г., при резком подъеме заболеваемости КЭ на евразийском континенте, зарегистрирован новый эндемичный регион по КЭ на о. Хоккайдо (Япония), где был диагностирован первый случай КЭ с благоприятным исходом [9]. Здесь были приняты широкие эколого-эпизоотологические исследования, изолированы штаммы ВКЭ, которые по молекулярно-генетической характеристике идентифицированы как штаммы дальневосточного субтипа [41]. В 2016–2017 гг. здесь же зарегистрированы еще 3 новых случая КЭ, 2 из которых закончились летальным исходом [25], что свидетельствовало о повышении активности действующего природного очага КЭ на северных территориях Японии, о. Хоккайдо. Именно эти случаи обращают на себя внимание в отношении активизации природных очагов КЭ на самой крайней восточной очаговой территории Дальневосточного региона.

Не менее удивительными находками явились случаи изоляции штаммов ВКЭ из легочной ткани диких грызунов, отловленных в Южной Корее [8]. К настоящему времени известны уже 7 таких изолятов, которые по молекулярно-генетической

характеристике оказались штаммами европейского субтипа. Этот факт пока не получил четкого объяснения, как и обнаружение таких штаммов ВКЭ на юго-восточной территории Дальнего Востока, столь далекого от Европейского региона. Однако такие находки открывают новые горизонты и расширяют наше понимание о возможном формировании новых очагов с ранее неизвестными штаммами, а также о постоянно происходящих процессах, определяющих устойчивость или изменчивость популяции ВКЭ в природных очагах. Примером тому послужила изоляция двух новых штаммов ВКЭ из диких грызунов *Marmota himalayana* на территориях ранее неизвестных природных очагов (Тянь-Шань, Китай) [7]. На основе молекулярно-генетического анализа полипротеина этих штаммов (Нim-ТВЕV) выявлена идентичность нуклеотидов в 83,5–85,2%, а также аминокислот в 92,6–94,2% с другими тремя субтипами ВКЭ. Уровень идентичности нуклеотидов и аминокислот штаммов ВКЭ европейского и сибирского субтипов по сравнению с дальневосточным субтипом составляет 83,2–85,5 и 93,0–95,2% соответственно. Полученные убедительные отличия этих штаммов от штаммов ВКЭ трех субтипов позволили авторам заявить о новом — гималайском — субтипе вируса КЭ (Нim-ТВЕV), который, по мнению авторов [7], был «скрыт» в течение сотен лет. Однако можно предположить, что идут процессы видообразования новых субтипов ВКЭ.

Наиболее полное представление о дальневосточной популяции ВКЭ получено нами в последнее десятилетие XX в. на основе полногеномной характеристики 50 штаммов ВКЭ, изолированных от пациентов с разными клиническими проявлениями инфекции — от очаговых до инанпаратных форм, а также из иксодовых клещей, с различной исторической давностью их изоляции. Дано описание биологических свойств [42, 43] и молекулярно-генетической характеристики дальневосточной популяции ВКЭ [44, 45], начиная с описания полногеномной последовательности прототипного штамма Софбин, впервые выполненного А.Г. Плетневым с соавт. [46]. Комплексные данные о значительном числе дальневосточных штаммов ВКЭ, охарактеризованных и зарегистрированных в GenBank, явились основой и толчком для изучения и сравнительного анализа различий многочисленных штаммов ВКЭ, выделенных на территории евразийского континента [47–50].

Заключение

Несмотря на более чем 80-летний период изучения КЭ, исследователи, используя новые современные подходы и методы изучения, постоянно расширяют перед собой задачи, решение которых постепенно открывает особенности жизнедеятель-

ности вирусной популяции на определенных территориях природных очагов этой инфекции и помогает понять, насколько бесконечна и сложна для изучения эта проблема.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зильбер Л.А. Весенний (весенне-летний) эпидемический клещевой энцефалит. *Архив биологических наук*. 1939; 56(2): 9-37.
2. Онищенко Г.Г., Федоров Ю.М., Пакскина Н.Д. Организация надзора за клещевым энцефалитом и меры по его профилактике в Российской Федерации. *Вопросы вирусологии*. 2007; 52(5): 8-10.
3. Злобин В.И., Рудаков Н.В., Малов И.В. *Клещевые трансмиссивные инфекции*. Новосибирск: Наука; 2015.
4. Кучерук В.В., Иванова Л.М., Неронов В.М. *Клещевой энцефалит. География природноочаговых болезней человека в связи с задачами их профилактики*. М.; 1969: 171-216.
5. Коренберг Э.И. *Биохорологическая структура вида (на примере таежного клеща)*. М.: Наука; 1979.
6. Коренберг Э.И., Ковалевский Ю.В. Районирование ареала клещевого энцефалита. В кн.: *Итоги науки и техники: Медицинская география*. М.: ВИНТИ; 1981. Том 11.
7. Sun R.X., Lai S.J., Yang Y., Li X.L., Liu K., Yao H.W., et al. Mapping the distribution of tick-borne encephalitis in mainland China. *Ticks Tick Borne Dis*. 2017; 8(4): 631-9. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.04.009>
8. Yun S.M., Kim S.Y., Ju Y.R., Han M.G., Jeong Y.E., Ryou J. First complete genomic characterization of two tick-borne encephalitis virus isolates obtained from wild rodents in South Korea. *Virus Genes*. 2011; 42(3): 307-16. DOI: <http://doi.org/10.1007/s11262-011-0575-y>
9. Takashima I., Morita K., Chiba M., Hayasaka D., Sato T., Takezawa C., et al. A case of tick-borne encephalitis in Japan and isolation of the virus. *J. Clin. Microbiol*. 1997; 35(8): 1943-7.
10. Леонихин С.П., Леонова Г.Н. *Экология и географическое распространение арбовирусов*. М.: Медицина; 1985.
11. Беликова Н.П. Иксодовые клещи. В кн.: *Природноочаговые болезни в Приморском крае*. Владивосток; 1975: 162-80.
12. Волков В.И. *Медико-экологический атлас Хабаровского края и Еврейской автономной области*. Хабаровск; 2005.
13. Meng F., Ding M., Tan Z., Zhao Z., Xu L., Wu J., et al. Virome analysis of tick-borne viruses in Heilongjiang Province, China. *Ticks Tick Borne Dis*. 2019; 10(2): 412-20. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.12.002>
14. Takeda T., Ito T., Chiba M., Takahashi K., Niioka T., Takashima I. Isolation of tick-borne encephalitis virus from *Ixodes ovatus* (Acari: Ixodidae) in Japan. *J. Med. Entomol*. 1998; 35(3): 227-31. DOI: <http://doi.org/10.1093/jmedent/35.3.227>
15. Takeda T., Ito T., Osada M., Takahashi K., Takashima I. Isolation of tick-borne encephalitis virus from wild rodents and a seroepizootiologic survey in Hokkaido, Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 1999; 60(2): 287-91. DOI: <http://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.287>
16. Якименко В.В., Дрокин Д.А., Калмин О.Б., Богданов И.И., Иванов Д.И. К вопросу о влиянии host-эффекта на штаммовую изменчивость вируса клещевого энцефалита. *Вопросы вирусологии*. 1996; 41(3): 112-7.
17. Шаповал А.Н. *Клещевой энцефаломиелит*. М.: Медицина; 1980.
18. Леонова Г.Н. О нозологической однородности и эволюции клещевого энцефалита. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2010; (3): 19-22.
19. Сомова Л.М., Леонова Г.Н. Патология центральной нервной системы при дальневосточном клещевом энцефалите. В кн.: Ишмухаметов А.А., ред. *Патология нейроинфекций*,

- вызываемых вирусами комплекса клещевого энцефалита. М.: Синтерия; 2018: 19-49.
DOI: <http://doi.org/10.26100/5DQY-TN22>
20. Zhang D.H., Zhang Z.X., Wang Y.M. Study on the trend of the epidemic of tick-borne encephalitis in Heilongjiang province. *Ji Bing Jian Ce*. 2000; 15: 57-8. (in Chinese)
 21. Lu Z., Bröker M., Liang G. Tick-Borne Encephalitis in Mainland China. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2008; 8(5): 713-20.
DOI: <http://doi.org/10.1089/vbz.2008.0028>
 22. Леонова Г.Н. Динамика эпидемической ситуации по клещевому энцефалиту на Дальнем Востоке. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2015; 14(3): 17-22.
 23. Мельникова О.В., Андаев Е.И. Связь манифестных случаев клещевого вирусного энцефалита с некоторыми демографическими, социальными и экологическими факторами. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2014; (4): 37-45.
 24. Мерзлова Н.Б., Серова И.А., Ягодина А.Ю. Классификации инфекционных и паразитарных болезней по социологическим критериям. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2011; (2): 35-9.
 25. Yoshii K., Song J.Y., Park S.B., Yang J., Schmitt H.J. Tick-borne encephalitis in Japan, Republic of Korea and China. *Emerg. Microbes Infect.* 2017; 6(9): e82.
DOI: <http://doi.org/10.1038/em.2017.69>
 26. Леонова Г.Н., Беликов С.И., Кондратов И.Г. Современный взгляд на дальневосточную популяцию вируса клещевого энцефалита. *Медицинская вирусология*. 2017; 31(1): 32.
 27. Захарычева Т.А. *Клещевой энцефалит в Хабаровском крае: вчера, сегодня, завтра*. Хабаровск; 2014.
 28. Драгомерецкая А.Г., Мжельская Т.В., Ковальский А.Г., Высочина Н.П., Троценко О.Е., Караванская Т.Н. и др. Результаты мониторинга за активностью природных очагов трансмиссивных инфекций на территории Хабаровского края в эпидемический сезон 2016 года. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2017; (32): 45-51.
 29. Pukhovskaya N.M., Morozova O.V., Vysochina N.P., Belozeroва N.B., Bakhmetyeva S.V., Zdanovskaya N.I., et al. Tick-borne encephalitis virus in arthropod vectors in the Far East of Russia. *Ticks Tick Borne Dis*. 2018; 9(4): 824-33.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.01.020>
 30. Шутикова А.Л., Леонова Г.Н., Лубова В.А. Молекулярно-генетический мониторинг как основа современного эпидемиологического надзора за клещевыми инфекциями. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(7): 424-9.
DOI: <http://doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-7-424-429>
 31. Леонова Г.Н., Лубова В.А., Иванис В.А. Мониторинг возбудителей клещевых инфекций на территории Приморского края в период 2014–2018 гг. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2018; (4): 10-4.
 32. Лубова В.А., Леонова Г.Н., Бондаренко Е.И. Комплексная характеристика природных очагов клещевых инфекций на юго-восточных территориях Сихотэ-Алиня. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2017; (1): 30-5.
DOI: <http://doi.org/10.5281/zenodo.345611>
 33. Мельникова О.В., Адельшин Р.В., Корзун В.М., Трушина Ю.Н., Андаев Е.И. Характеристика изолятов вируса клещевого энцефалита из природных очагов в Иркутской области и уточнение генотипического пейзажа. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(5): 229-34.
DOI: <http://doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-5-229-234>
 34. Леонова Г.Н. Сравнительный анализ эффективности методов верификации вируса клещевого энцефалита. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(11): 686-9.
DOI: <http://doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-11-686-689>
 35. Ефимова А.Р., Карань Л.С., Дроздова О.М., Григорьева А.Я., Фролова Н.А., Шейдерова И.Д. и др. Современная эпидемиологическая ситуация по клещевому энцефалиту и генетическое разнообразие ВКЭ на территории Кемеровской области. *Труды Института полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П. Чумакова РАМН. Медицинская вирусология*. 2015; 29(1): 3-15.
 36. Иванов М.К., Прасолова М.А., Тимофеев Д.И., Глушков С.А., Кандрушин Е.В. Одновременное выявление двух мишеней – подход к решению проблем ПЦР-диагностики заболеваний, вызываемых вирусами с высокой генетической изменчивостью. В кн.: *Материалы научно-практической конференции «Диагностика и профилактика инфекционных болезней на современном этапе»*. Новосибирск; 2016: 156-7.
 37. Коренберг Э.И. Молекулярно-биологические методы и изучение феномена природной очаговости болезней. *Успехи современной биологии*. 2012; 132(5): 448-62.
 38. Ternovoi V.A., Protopopova E.V., Chausov E.V., Novikov D.V., Leonova G.N., Netesov S.V., et al. Novel variant of tickborne encephalitis virus, Russia. *Emerg. Infect. Dis*. 2007; 13(10): 1574-8.
DOI: <http://doi.org/10.3201/eid1310.070158>
 39. Si B.Y., Jiang T., Zhang Y., Deng Y.Q., Huo Q.B., Zheng Y.C., et al. Complete genome sequence analysis of tick-borne encephalitis viruses isolated in northeastern China. *Arch. Virol*. 2011; 156(8): 1485-8.
DOI: <http://doi.org/10.1007/s00705-011-1031-y>
 40. Zhang Y., Si B.Y., Liu B.H., Chang G.H., Yang Y.H., Huo Q.B., et al. Complete genomic characterization of two tick-borne encephalitis viruses isolated from China. *Virus Res*. 2012; 167(2): 310-31.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.05.015>
 41. Hayasaka D., Suzuki Y., Kariwa H., Ivanov L., Volkov V., Demenev V., et al. Phylogenetic and virulence analysis of tick-borne encephalitis viruses from Japan and far-eastern Russia. *J. Gen. Virology*. 1999; 80(Pt. 12): 3127-35.
DOI: <http://doi.org/10.1099/0022-1317-80-12-3127>
 42. Leonova G.N., Belikov S.I., Kondratov I.G., Takashima I. Comprehensive assessment of the genetics and virulence of tick-borne encephalitis virus strains isolated from patients with inapparent and clinical forms of the infection in the Russian Far East. *Virology*. 2013; 443(1): 89-98.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.029>
 43. Leonova G.N., Maystrovskaya O.S., Kondratov I.G., Takashima I., Belikov S.I. The nature of replication of tick-borne encephalitis virus strains isolated from residents of the Russian Far East with inapparent and clinical forms of infection. *Virus Res*. 2014; 189: 34-42.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.04.004>
 44. Belikov S.I., Kondratov I.G., Potapova U.V., Leonova G.N. The relationship between the structure of the tick-borne encephalitis virus strains and their pathogenic properties. *PLoS One*. 2014; 9(4): e94946.
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0094946>
 45. Leonova G.N., Belikov S.I., Kondratov I.G. Characteristics of far eastern strains of tick-borne encephalitis virus. *Arch. Virol*. 2017; 162(8): 2211-8.
DOI: <http://doi.org/10.1007/s00705-017-3309-1>
 46. Pletnev A.G., Yamshchikov V.F., Blinov V.M. Nucleotide sequence of the genome and complete amino acid sequence of the polyprotein of tick-borne encephalitis virus. *Virology*. 1990; 174(1): 250-63.
DOI: [http://doi.org/10.1016/0042-6822\(90\)90073-z](http://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90073-z)
 47. Bertrand Y., Töpel M., Elväng A., Melik W., Johansson M. First dating of a recombination event in mammalian tick-borne flaviviruses. *PLoS One*. 2012; 7(2): e31981.
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0031981>
 48. Norberg P., Roth A., Bergström T. Genetic recombination of tick-borne flaviviruses among wild-type strains. *Virology*. 2013; 440(2): 105-16.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.virol.2013.02.017>

49. Bertrand Y., Johansson M., Norberg P. Revisiting recombination signal in the tick-borne encephalitis virus: a simulation approach. *PLoS One*. 2016; 11(10): e0164435. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0164435>

50. Vorovitch M.F., Kozlovskaya L.I., Romanova L.I., Chernokhaeva L.L., Ishmukhametov A.A., Karganova G.G. Genetic description of a tick-borne encephalitis virus strain Sofjin with the longest history as a vaccine strain. *Springerplus*. 2015; 4: 761. DOI: <http://doi.org/10.1186/s40064-015-1561-y>

REFERENCES

1. Zilber L.A. Spring (spring-summer) epidemical tick-borne encephalitis. *Arkiv biologicheskikh nauk*. 1939; 56(2): 9-37. (in Russian)

2. Onishchenko G.G., Fedorov Yu.M., Paksina N.D. Organization of supervision of tick-borne virus encephalitis and ways of its prevention in the Russian Federation. *Voprosy virusologii*. 2007; 52(5): 8-10. (in Russian)

3. Zlobin V.I., Rudakov N.V., Malov I.V. *Tick-Borne Infections [Kleshchevye transmissivnye infektsii]*. Novosibirsk: Nauka; 2015. (in Russian)

4. Kucheruk V.V., Ivanova L.M., Neronov V.M. *Tick-Borne Encephalitis. The Geography of Natural Focal Human Diseases in Connection with the Tasks of Their Prevention [Kleshchevoy entsefalit. Geografiya prirodnoochagovykh bolezney cheloveka v svyazi s zadachami ikh profilaktiki]*. Moscow; 1969: 171-216. (in Russian)

5. Korenberg E.I. *Biochorological Structure of the Species (on the Example of a Taiga Tick) [Biokhorologicheskaya struktura vida (na primere taezhnogo kleshcha)]*. Moscow: Nauka; 1979. (in Russian)

6. Korenberg E.I., Kovalevskiy Yu.V. Zoning of the area of tick-borne encephalitis. In: *Results of Science and Technology: Medical Geography. Volume 11 [Itogi nauki i tekhniki: Meditsinskaya geografiya. Tom 11]*. Moscow: VINITI; 1981. (in Russian)

7. Sun R.X., Lai S.J., Yang Y., Li X.L., Liu K., Yao H.W., et al. Mapping the distribution of tick-borne encephalitis in mainland China. *Ticks Tick Borne Dis*. 2017; 8(4): 631-9. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.04.009>

8. Yun S.M., Kim S.Y., Ju Y.R., Han M.G., Jeong Y.E., Ryou J. First complete genomic characterization of two tick-borne encephalitis virus isolates obtained from wild rodents in South Korea. *Virus Genes*. 2011; 42(3): 307-16. DOI: <http://doi.org/10.1007/s11262-011-0575-y>

9. Takashima I., Morita K., Chiba M., Hayasaka D., Sato T., Takezawa C., et al. A case of tick-borne encephalitis in Japan and isolation of the virus. *J. Clin. Microbiol*. 1997; 35(8): 1943-7.

10. Chunikhin S.P., Leonova G.N. *Ecology and Geographical Distribution of Arboviruses [Ekologiya i geograficheskoe rasprostraneniye arbovirusov]*. Moscow: Meditsina; 1985. (in Russian)

11. Belikova N.P. Ixodid ticks. In: *Natural Focal Diseases in the Primorsky Territory [Prirodnoochagovye bolezni v Primorskoy krae]*. Vladivostok; 1975: 162-80. (in Russian)

12. Volkov V.I. *Medical and Environmental Atlas of the Khabarovsk Territory and the Jewish Autonomous Region [Mediko-ekologicheskij atlas Khabarovskogo kraja i Evreyskoy avtonomnoy oblasti]*. Khabarovsk; 2005. (in Russian)

13. Meng F., Ding M., Tan Z., Zhao Z., Xu L., Wu J., et al. Virome analysis of tick-borne viruses in Heilongjiang Province, China. *Ticks Tick Borne Dis*. 2019; 10(2): 412-20. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.12.002>

14. Takeda T., Ito T., Chiba M., Takahashi K., Niioka T., Takashima I. Isolation of tick-borne encephalitis virus from Ixodes ovatus (Acari: Ixodidae) in Japan. *J. Med. Entomol*. 1998; 35(3): 227-31. DOI: <http://doi.org/10.1093/jmedent/35.3.227>

15. Takeda T., Ito T., Osada M., Takahashi K., Takashima I. Isolation of tick-borne encephalitis virus from wild rodents and a seroprevalence survey in Hokkaido, Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 1999; 60(2): 287-91. DOI: <http://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.287>

16. Yakimenko V.V., Drokin D.A., Kalmin O.B., Bogdanov I.I., Ivanov D.I. To the question of the effect of the host on variability of tick-borne encephalitis virus strain. *Voprosy virusologii*. 1996; 41(3): 112-7. (in Russian)

17. Shapoval A.N. *Tick-borne Encephalomyelitis [Kleshchevoy entsefalomielit]*. Moscow: Meditsina; 1980. (in Russian)

18. Leonova G.N. On the nosological homogeneity and evolution of tick-borne encephalitis. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2010; (3): 19-22. (in Russian)

19. Somova L.M., Leonova G.N. Pathology of the central nervous system with Far Eastern tick-borne encephalitis. In: Ishmukhametov A.A., ed. *Pathology of Neuroinfections Caused by Tick-Borne Encephalitis Complex Viruses [Patologiya neyroinfektsiy, vyzvaemykh virusami kompleksa kleshchevogo entsefalita]*. Moscow: Sinteriya; 2018: 19-49. DOI: <http://doi.org/10.26100/5DQY-TN22> (in Russian)

20. Zhang D.H., Zhang Z.X., Wang Y.M. Study on the trend of the epidemic of tick-borne encephalitis in Heilongjiang province. *Ji Bing Jian Ce*. 2000; 15: 57-8. (in Chinese)

21. Lu Z., Bröker M., Liang G. Tick-Borne Encephalitis in Mainland China. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2008; 8(5): 713-20. DOI: <http://doi.org/10.1089/vbz.2008.0028>

22. Leonova G.N. The dynamics of the epidemic situation of tick-borne encephalitis in the Far East. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika*. 2015; 14(3): 17-22. (in Russian)

23. Mel'nikova O.V., Andaev E.I. The manifest tick-borne encephalitis cases and their relationship with some demographic, social and ecological factors. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika*. 2014; (4): 37-45. (in Russian)

24. Merzlova N.B., Serova I.A., Yagodina A.Yu. Classification of infectious and parasitic diseases according to sociological criteria. *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni*. 2011; (2): 35-9. (in Russian)

25. Yoshii K., Song J.Y., Park S.B., Yang J., Schmitt H.J. Tick-borne encephalitis in Japan, Republic of Korea and China. *Emerg. Microbes Infect*. 2017; 6(9): e82. DOI: <http://doi.org/10.1038/emi.2017.69>

26. Leonova G.N., Belikov S.I., Kondratov I.G. A modern view of the Far Eastern population of the tick-borne encephalitis virus. *Meditsinskaya virusologiya*. 2017; 31(1): 32. (in Russian)

27. Zakharycheva T.A. *Tick-Borne Encephalitis in the Khabarovsk Territory: Yesterday, Today, Tomorrow [Kleshchevoy entsefalit v Khabarovskom krae: vchera, segodnya, zavtra]*. Khabarovsk; 2014. (in Russian)

28. Dragomeretskaya A.G., Mzhel'skaya T.V., Koval'skiy A.G., Vysochina N.P., Trotsenko O.E., Karavyanskaya T.N., et al. Results of monitoring the natural foci of vector-borne infections activity on the territory of Khabarovsk region in epidemic season of 2016. *Dal'nevostochnyy zhurnal infektsionnoy patologii*. 2017; (32): 45-51. (in Russian)

29. Pukhovskaya N.M., Morozova O.V., Vysochina N.P., Belozerovaly N.B., Bakhmetyeva S.V., Zdanovskaya N.I., et al. Tick-borne encephalitis virus in arthropod vectors in the Far East of Russia. *Ticks Tick Borne Dis*. 2018; 9(4): 824-33. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.01.020>

30. Shutikova A.L., Leonova G.N., Lubova V.A. Molecular genetic monitoring as the basis of modern epidemiological surveillance of tick-borne infections. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2019; 64(7): 424-9. DOI: <http://doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-7-424-429> (in Russian)

31. Leonova G.N., Lubova V.A., Ivanis V.A. Monitoring of tick-borne pathogens in the territory of the Primorsky Territory in the period 2014–2018. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2018; (4): 10-4. (in Russian)

32. Lubova V.A., Leonova G.N., Bondarenko E.I. A complex characteristic of natural foci of tick-borne infections in the southeastern territories of Sikhote-Alin. *Zdorov'e. Meditsinskaya ekologiya. Nauka*. 2017; (1): 30-5.
DOI: <http://doi.org/10.5281/zenodo.345611> (in Russian)
33. Mel'nikova O.V., Adel'shin R.V., Korzun V.M., Trushina Yu.N., Andaev E.I. Characterization of tick-borne encephalitis virus isolates from natural foci in the Irkutsk region and clarification of the genotypic landscape. *Voprosy virusologii*. 2016; 61(5): 229-34.
DOI: <http://doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-5-229-234> (in Russian)
34. Leonova G.N. Comparative analysis of methods efficiency of verification of the tick-borne encephalite virus. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2019; 64(11): 686-9.
DOI: <http://doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-11-686-689> (in Russian)
35. Efimova A.R., Karan' L.S., Drozdova O.M., Grigor'eva A.Ya., Frolova N.A., Sheyderova I.D., et al. Tick-borne encephalitis in Kemerovo region: epidemiology and genetic diversity of TBEV. *Trudy Instituta poliomielitov i virusnykh entsefalitov imeni M.P. Chumakova RAMN. Meditsinskaya virusologiya*. 2015; 29(1): 3-15. (in Russian)
36. Ivanov M.K., Prasolova M.A., Timofeev D.I., Glushkov S.A., Kandrushin E.V. The simultaneous identification of two targets is an approach to solving the problems of PCR diagnostics of diseases caused by viruses with high genetic variability. In: *Materials of the Scientific-Practical Conference «Diagnosis and Prevention of Infectious Diseases at the Present Stage» [Materialy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Diagnostika i profilaktika infektsionnykh bolezney na sovremennom etape»]*. Novosibirsk; 2016: 156-7. (in Russian)
37. Korenberg E.I. Molecular biological methods and study of natural focal diseases. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2012; 132(5): 448-62. (in Russian)
38. Ternovoi V.A., Protopopova E.V., Chausov E.V., Novikov D.V., Leonova G.N., Netesov S.V., et al. Novel variant of tickborne encephalitis virus, Russia. *Emerg. Infect. Dis*. 2007; 13(10): 1574-8.
DOI: <http://doi.org/10.3201/eid1310.070158>
39. Si B.Y., Jiang T., Zhang Y., Deng Y.Q., Huo Q.B., Zheng Y.C., et al. Complete genome sequence analysis of tick-borne encephalitis viruses isolated in northeastern China. *Arch. Virol*. 2011; 156(8): 1485-8.
DOI: <http://doi.org/10.1007/s00705-011-1031-y>
40. Zhang Y., Si B.Y., Liu B.H., Chang G.H., Yang Y.H., Huo Q.B., et al. Complete genomic characterization of two tick-borne encephalitis viruses isolated from China. *Virus Res*. 2012; 167(2): 310-31.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.05.015>
41. Hayasaka D., Suzuki Y., Kariwa H., Ivanov L., Volkov V., Demenev V., et al. Phylogenetic and virulence analysis of tick-borne encephalitis viruses from Japan and far-eastern Russia. *J. Gen. Virology*. 1999; 80(Pt. 12): 3127-35.
DOI: <http://doi.org/10.1099/0022-1317-80-12-3127>
42. Leonova G.N., Belikov S.I., Kondratov I.G., Takashima I. Comprehensive assessment of the genetics and virulence of tick-borne encephalitis virus strains isolated from patients with inapparent and clinical forms of the infection in the Russian Far East. *Virology*. 2013; 443(1): 89-98.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.029>
43. Leonova G.N., Maystrovskaya O.S., Kondratov I.G., Takashima I., Belikov S.I. The nature of replication of tick-borne encephalitis virus strains isolated from residents of the Russian Far East with inapparent and clinical forms of infection. *Virus Res*. 2014; 189: 34-42.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.04.004>
44. Belikov S.I., Kondratov I.G., Potapova U.V., Leonova G.N. The relationship between the structure of the tick-borne encephalitis virus strains and their pathogenic properties. *PLoS One*. 2014; 9(4): e94946.
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0094946>
45. Leonova G.N., Belikov S.I., Kondratov I.G. Characteristics of far eastern strains of tick-borne encephalitis virus. *Arch. Virol*. 2017; 162(8): 2211-8.
DOI: <http://doi.org/10.1007/s00705-017-3309-1>
46. Pletnev A.G., Yamshchikov V.F., Blinov V.M. Nucleotide sequence of the genome and complete amino acid sequence of the polyprotein of tick-borne encephalitis virus. *Virology*. 1990; 174(1): 250-63.
DOI: [http://doi.org/10.1016/0042-6822\(90\)90073-z](http://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90073-z)
47. Bertrand Y., Töpel M., Elväng A., Melik W., Johansson M. First dating of a recombination event in mammalian tick-borne flaviviruses. *PLoS One*. 2012; 7(2): e31981.
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0031981>
48. Norberg P., Roth A., Bergström T. Genetic recombination of tick-borne flaviviruses among wild-type strains. *Virology*. 2013; 440(2): 105-16.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.virol.2013.02.017>
49. Bertrand Y., Johansson M., Norberg P. Revisiting recombination signal in the tick-borne encephalitis virus: a simulation approach. *PLoS One*. 2016; 11(10): e0164435.
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0164435>
50. Vorovitch M.F., Kozlovskaya L.I., Romanova L.Iu., Chernokhaeva L.L., Ishmukhametov A.A., Karganova G.G. Genetic description of a tick-borne encephalitis virus strain Sofjin with the longest history as a vaccine strain. *Springerplus*. 2015; 4: 761.
DOI: <http://doi.org/10.1186/s40064-015-1561-y>

Информация об авторе:

Леонова Галина Николаевна[✉] — д.м.н., проф., г.н.с. лаб. природно-очаговых трансмиссивных инфекций ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова», 690087, Владивосток, Россия.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-6387-1127>.
E-mail: galinaleon41@gmail.com

Information about the author:

Galina N. Leonova[✉] — D. Sci. (Med.), Prof., principal researcher, Laboratory of natural focal transmissible infections, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, 690087, Vladivostok, Russia.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-6387-1127>.
E-mail: galinaleon41@gmail.com



Модели *in vitro* для изучения вируса Зика

Пименова Е.В.^{1,2✉}, Храпова Н.П.^{1,2}, Замарина Т.В.^{1,2}

¹ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, 400131, Волгоград, Россия;

²ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет», 400131, Волгоград, Россия

В связи с глобализацией, увеличением торговых и миграционных потоков вероятность возникновения вспышек лихорадки Зика существенно возрастает во всем мире, включая Черноморское побережье Кавказа в России. Лихорадка Зика имеет тенденцию к быстрому распространению и расширению географических границ, поэтому изучение данного вируса остается актуальной задачей. Накопленные за последнее время знания способствовали всестороннему изучению вируса Зика, однако до сих пор многие вопросы этиологии, эпидемиологии, клиники, специфической диагностики и профилактики остаются нерешенными. Настоящий обзор основан главным образом на публикациях зарубежных авторов и ведущих международных организаций по изучению вируса Зика в культуре клеточных линий. В обзоре обобщены экспериментальные данные последних лет по применению клеточных линий, используемых в качестве клеточ-мишеней для изучения вируса Зика, отмечены их преимущества и недостатки, приведено сравнение чувствительности клеточных линий разного происхождения.

Ключевые слова: вирус Зика; клеточные линии; модель *in vitro*; обзор.

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

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

Для цитирования: Пименова Е.В., Храпова Н.П., Замарина Т.В. Модели *in vitro* для изучения вируса Зика. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(2): 159–164.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-159-164>

Поступила 25.10.2019
Принята в печать 12.01.2020

In vitro models for the study of Zika virus

Ekaterina V. Pimenova^{1,2✉}, Natalya P. Khrapova^{1,2}, Tatyana V. Zamarina^{1,2}

¹Volgograd Research Anti-Plague Institute, 400131, Volgograd, Russia;

²Volgograd State Medical University, 400131, Volgograd, Russia

Due to the globalization, increased trade and migration flows the probability of outbreaks of Zika fever is significantly increasing worldwide, including Black sea coast of the Caucasus in the Russian Federation. Zika fever tends to spread rapidly and to expand its geography, so the study of this virus remains an urgent task. The accumulated knowledge recently has contributed to a comprehensive study of Zika virus, but so far many questions of etiology, epidemiology, clinic, specific diagnosis and prevention remain unresolved. This review is based mainly on publications by foreign authors and leading international organizations dedicated to the study of Zika virus in the cell lines of various sources. The review summarizes recent experimental data on the use of cell lines as target cells for the study of Zika virus, their advantages and disadvantages, and the susceptibility of different cell lines to this virus. Information from bibliographic and abstract scientific databases, search websites, and publishers: RSCI, Web of Science, Scopus, MEDLINE, Google Scholar, PubMed, Springer Nature, Elsevier, and others was used in the preparation of the review.

Keywords: Zika virus; cell culture systems; model of *in vitro*.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

For citation: Pimenova E.V., Khrapova N.P., Zamarina T.V. *In vitro* models for the study of Zika virus. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(2): 159–164. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-159-164>

Received 25 October 2019
Accepted 12 January 2020

Введение

Вирус Зика был впервые выделен в 1947 г. в лесу Зика в Уганде из макаки резуса. Позже вирус-специфические антитела были обнаружены в крови инфицированных людей, это стало первым доказательством того, что вирус может передаваться человеку. Более поздние исследования выявили инфекцию в других регионах Африки, а также в азиатских странах. До 2007 г. вирусную инфекцию считали инфекцией ограниченного географического распространения [1–5].

Первая крупная вспышка лихорадки Зика произошла в 2007 г. на острове Яп в южной части Тихого океана, во время нее 73% жителей острова были инфицированы [6, 7]. Позже вспышки фиксировались во Французской Полинезии и на территориях Тихоокеанского региона, в 2014 г. — в Чили и Бразилии. В настоящее время наблюдается быстрая интродукция лихорадки Зика из эндемичных регионов. С 2014 г. в мире зарегистрировано 9252 завозных случая в 52 странах (Бельгия, Чехия, Франция, Германия, Греция, Венгрия, Италия, Нидерланды, Испания, Великобритания, США, Канада, Аргентина и др.)¹. За последние 7 лет на территории России

было верифицировано 23 таких случая, связанных с поездками в Доминиканскую Республику, Мексику, Индию, Таиланд, Колумбию и Китай².

Как и при других альфа- и флавивирусных инфекциях, при лихорадке Зика иногда наблюдается сопутствующая симптоматика, включая синдром Гийена–Барре (острая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия) [8–10] и микроцефалию у младенцев, родившихся у инфицированных матерей [11–14].

Для изучения вопросов патогенеза, патофизиологии, а также для рассмотрения фенотипических и пролиферативных свойств возбудителя вирусной инфекции Зика в последние годы стали широко использовать модели *in vitro* с применением клеточных систем.

Нашей целью было систематизировать и обобщить данные литературы последних лет по вопросам изучения вируса Зика на модели *in vitro*.

Основная часть

К. Himmelsbach с соавт. [15] изучили способность вируса Зика репродуцироваться в культуре клеток различного происхождения. Все клеточные линии (A549 — клетки эпителия легкого человека, CHO — клетки яичника китайского хомячка, COS7 — клетки почки африканской зеленой марьтышки, HepG2/C3A — клетки печени человека, Huh7.5 — клетки печени человека, HaCaT — клетки кожи человека, N29.1 — клетки гипоталамуса мыши, SH-SY5Y — клетки нейробластомы костного мозга человека, Vero — клетки почки африканской зеленой марьтышки и 293T — клетки почки человека) инфицировали полинезийским штаммом Зика азиатского генотипа. Через 48 ч в клетках определяли нагрузку специфической РНК и титры инфекционного вируса, используя ПЦР и заражение клеточной культуры.

Авторы установили, что наибольшая концентрация внутриклеточных инфекционных вирусных

¹ ProMEDmail. Available at: <http://promedmail.org>
WHO. Zika virus situation reports.
Available at: <https://www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report/en/>
Surveillance Atlas of Infectious Diseases.
Available at: <http://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>
Pan American Health Organization: PAHO/WHO.
Available at: <http://www.paho.org/hq/index>
Communicable disease threats report. CDTR Week 44, 27 October – 2 November 2019. Available at: https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Communicable-disease-threats-report-2-nov-2019_0.pdf
Chikungunya, dengue et zika - Données de la surveillance renforcée en France. Available at: <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-a-transmission-vectorielle/chikungunya/articles/donnees-en-france-metropolitaine/chikungunya-dengue-et-zika-donnees-de-la-surveillance-renforcee-en-france-metropolitaine-en-2019>
CDC Centres for Disease Control and Prevention. Zika Virus. 2018 Case Counts in the US. Available at: <https://www.cdc.gov/zika/reporting/2018-case-counts.html>
Canada.ca. Zika virus: For health professionals.
Available at: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/diseases/zika-virus/surveillance-zika-virus.html>
ZIKA — Información Relevante — Secretaría de Salud Gobierno de Mexico. Available at: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/zika-informacion-relevante>
Vigilancia en Salud Pública — virus del Zika — Portales del Portal. Available at: <http://temas.sld.cu/vigilanciaensalud/tag/virus-del-zika>
Sitio Web del Ministerio de Salud de Costa Rica. Bienvenido. Available at: <https://www.ministeriodesalud.go.cr>
Ministerio de Salud de Argentina.
Available at: <https://www.argentina.gob.ar/salud>
Ministério da Saúde. Portal do Governo Brasileiro.
Available at: <http://portalm.sau.de.gov.br>
Ministerio de Salud Estado Plurinacional de Bolivia.
Available at: <https://snis.minsalud.gob.bo>

Sitio Oficial del Ministerio de Salud de El Salvador.
Available at: <http://www.salud.gob.sv>
Ministerio de Salud de la República de Panamá.
Available at: <http://www.minsa.gob.pa>
Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades. Available at: <http://www.dge.gob.pe/portal>
Dirección General de Vigilancia de la Salud (D.G.V.S.).
Available at: <http://vigisalud.gov.py/paginas/pag/Actualizaciones-Epidemiologicas>
National Environment Agency. Zika Cases and Clusters.
Available at: <https://www.nea.gov.sg/dengue-zika/zika/zika-cases-and-clusters>

² Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. РИА Новости: Интервью руководителя Роспотребнадзора Анны Поповой на ВЭФ-2019. Режим допуска: https://www.rospotrebnadzor.ru/press_service/publications/?ELEMENT_ID=12605&sphrase_id=1908651 (дата обращения: 04.09.2019)

частиц была в культуре клеток Vero; достаточно высокая — в Huh7.5, COS7, 293T и A549; значительно меньшая — в N29.1 и SH-SY5Y; самая низкая — в HeLa. В клетках CHO вирусные частицы не были обнаружены. Выраженный цитопатогенный эффект (ЦПЭ) наблюдался в культурах клеток A549 и Vero.

Концентрация фрагментов генома вируса Зика, выявляемых внутри клеток и в супернатанте при инфицировании этих же видов клеточных культур, оказалась приблизительно одинаковой [15].

J.F. Chan с соавт. [16] использовали 33 вида перевиваемых культур клеток органов и тканей различных млекопитающих и птиц: JEG-3, HEK, HeLa, HOSE6-3, LNCaP, 833KE, SF268, RD, ARPE19, Hep-2, Calu-3, HFL, Caco-2, Huh7, THP-1, U937, Raji, H9, Vero, LLC-MK2, PK-15, MDCK, CRFK, TP2, L929, BV2, 3T3, R28, RK3E, RK-13, BHK21, C6/36. Для изучения чувствительности клеточных линий к вирусу Зика были использованы изоляты двух генотипов:

- выделенный от больного в Пуэрто-Рико (штамм PRVABC59) в Южной Америке — представитель азиатского генотипа;
- изолированный из крови обезьяны макака резус в Уганде в 1947 г. (штамм MR766) — представитель восточно-африканского генотипа.

Анализ результатов тестирования 18 клеточных линий человеческого происхождения показал, что штаммы вируса Зика, выделенные в Южной Америке и в Уганде, в течение всего срока эксперимента (5 сут) вызывали ЦПЭ в 14 видах клеточных культур: клетки трофобластов линии JEG-3, клетки органов мочеполовой системы HEK, HeLa, HOSE6-3, LNCaP и 833KE, клетки нейромышечной системы SF268 и RD, клетки эпителия сетчатки глаза взрослого человека ARPE19, клетки органов дыхания Hep2, Calu-3 и HFL, клетки аденокарциномы ободочной кишки Caco-2 и линия клеток гепатокарциномы человека Huh7.

ЦПЭ на 3-й день эксперимента наблюдали в 8 из 14 клеточных культур: JEG-3, SF268, RD, ARPE19, Hep-2, HFL, Caco-2 и Huh7. Это коррелирует с динамикой экспрессии в клетках неструктурного вирусного белка NS1.

Наиболее выраженный ЦПЭ наблюдался в культурах клеток JEG-3, SF268, RD, Caco-2 и Huh7 (>50% пораженных клеток в монослое).

В течение всего срока эксперимента дегенеративные изменения регистрировали в 8 из 15 клеточных культур нечеловеческого происхождения: Vero, LLC-MK2, PK-15, CRFK, RK-13, BHK21, DF-1 и C6/36. Репродукцию вирусных частиц не генерировали клетки, полученные от мышей, крыс и летучих мышей [16].

S. Ramos da Silva и соавт. [17] инфицировали клеточные линии двумя африканскими (IbH30656 и MR766) и двумя азиатскими (PRVABC59 и H/

FP/2013) штаммами вируса Зика. Чувствительность клеток-мишеней к вирусу Зика определяли по нарастанию титров вируса в культуре клеток, синтезу специфических белков в культуре, а также по репликации вирусного генома. В работе были использованы 14 клеточных линий различного происхождения, но только в клетках Vero авторы регистрировали значительное нарастание титра вируса. Все линии культур клеток человеческого происхождения, использованные в работе, были восприимчивы к штаммам вируса Зика, однако клетки 293T и HeLa показали избирательную восприимчивость только к африканским штаммам. Клетки 293T на высоком уровне экспрессировали неструктурный белок NS1 африканского штамма, но не белок NS1 азиатского штамма. Очевидных различий в репликации вирусного генома этих штаммов не обнаружено [17].

K.L. Barr и соавт. [18] исследовали супернатанты, собранные через 72 ч после инфицирования клеток вирусом Зика. Результаты показали, что культуры клеток WHC-17 и TB 1 Lu не восприимчивы к вирусу Зика, что было подтверждено с помощью ПЦР. Выраженную репликацию вируса Зика наблюдали в культуре клеток ОК в отличие от клеток E.Derm, PK, FoLu, CRFK и LLC-MK2.

I. Vicenti с соавт. [19] изучили репликацию вируса в культуре клеток комаров *Ae. albopictus* (C6/36). В работе использовали два азиатских штамма вируса: первый (штамм SPH) был изолирован от больного человека, второй (штамм Mex 1-44) — из комаров рода *Ae. aegypti*, а также два штамма африканского происхождения (MR766 и IbH). Установлено, что африканские изоляты вируса быстрее реплицируются в клетках C6/36, чем в комарах рода *Ae. aegypti*. По данным K.A. Willard и соавт. [20], эти штаммы оказывали более выраженный ЦПЭ в клетках Vero.

I. Vicenti с соавт. [19] изучили также бляшкообразование в клеточных линиях человека (U87, A549, Huh7), комаров (C6/36) и обезьяны (Vero E6). В культуре клеток Huh7 наблюдали формирование бляшек на 3-й день после инфицирования, а также максимальную продукцию вируса Зика. В культуре клеток C6/36 бляшки формировались медленнее и в меньшем количестве по сравнению с другими клеточными линиями.

Известно, что вирус Зика может передаваться половым путем, но в настоящее время мало данных о типах клеток, поддерживающих репликацию вируса и его персистенцию в репродуктивной системе человека. A. Kumar с соавт. [21] в этих целях использовали два основных типа клеток (Сертоли и Лейдига), поддерживающих сперматогенез [22]. До начала экспериментов штаммы восточно-африканского и азиатского генотипов пассировали в клетках C6/36 и титровали с использованием клеток Vero. Эксперименты с клетками Лейдига проводили по-

сле одного пассажа в культуре, тогда как клетки Сертоли были взяты в эксперимент между 3–5-м пассажами. Эти клеточные линии были инфицированы африканским (MR766) и американским (PRVABC59) штаммами вируса Зика. На основании полученных данных авторы сделали выводы, что клетки Сертоли более чувствительны к вирусу, т.к. на их поверхности находятся рецепторы семейства TAM Ax1, которые опосредованно усиливают репликацию вируса Зика и поддерживают его персистенцию в организме.

I. Vicenti и соавт. [19] установлено, что в первичной клеточной линии Сертоли вирус активно реплицируется в течение 6 нед, что представляет интерес для понимания персистенции вируса в мужской репродуктивной системе. Эти результаты были подтверждены ранее проведенными исследованиями на лабораторных животных (мышях) [23–25] и *in vitro* на клетках человека [26].

На основе полученных данных были сделаны выводы о том, что высокая восприимчивость клеток Сертоли к вирусу Зика может способствовать проникновению вируса в просвет семенных канальцев, длительно поддерживать репликацию вируса и обеспечивать возможность передачи вирусной инфекции половым путем. В первичных клеточных линиях Лейдига скорость репликации вируса Зика была значительно ниже, несмотря на то что в экспериментах на лабораторных мышях установлен факт размножения вируса в клетках мочеполовой системы животных [26, 27].

В одном из исследований [28] авторы изучали репликацию вируса Зика в клетках предстательной железы человека. Одна линия — 19I (стромальные клетки простаты) — получена из предстательной железы здорового донора, представляет собой не-трансформированные стволовые клетки, поддерживающие фенотип при пассировании в культуре в течение нескольких месяцев [29]. Вторая линия — это эпителиальные клетки аденокарциномы простаты LNCaP и органеллы простаты 19I, выделенные по методу [29].

В этих экспериментах были использованы три изолята вируса Зика:

- FLR, выделенный в культуре C6/36 из сыворотки крови человека в Колумбии в 2015 г. [30];
- FLA, полученный из первичных дендритных клеток крови больного во Флориде, который также был инфицирован в Колумбии в 2015 г.;
- HN16, выделенный от больного в Хьюстоне, штат Техас, и культивированный в клетках Vero [31].

Полученные данные свидетельствовали о том, что клетки предстательной железы и эпителиальные клетки человека репродуцируют вирус с различной активностью репродукции у разных штам-

мов. Установлено, что стромальная среда является оптимальной для репликации вируса, что вносит значительный вклад в понимание патогенеза передачи вируса половым путем [32–34].

Вирус Зика из-за способности заражать стволовые клетки нейронов-предшественников является причиной появления патологических процессов в головном мозге на ранних сроках развития эмбриона. С. Kaid с соавт. [35] изучили влияние вируса на стволовые клетки различного происхождения:

- 1) клеточные линии из эмбриональных опухолевых клеток центральной нервной системы (ЦНС):
 - DAOY — медуллобластома;
 - USP13-MED — медуллобластома;
 - USP7-ATRT — внутренняя атипичная тератоидная/рабдоидная опухоль;
- 2) клетки опухоли, не связанные с ЦНС:
 - MCF-7 — рак молочной железы;
 - HCT-8 — колоректальный рак;
 - DU-145 — рак предстательной железы, клетки получены из метастаза в головном мозге.

Для контроля были взяты плюрипотентные стволовые клетки и нейроны, полученные от человека.

Результаты исследования показали, что вирус Зика вызывает значительное снижение роста и гибель клеток культур DAOY, USP13-MED, выращенный ЦПЭ наблюдали в USP7-ATRT. В инфицированных культурах USP7-ATRT и USP13-MED авторы регистрировали дегенерацию более чем 50% клеток монослоя, а в культуре DAOY — только 40%. Репродукция вируса в клетках MCF-7 и HCT-8 отсутствовала.

На основе полученных данных авторы сделали вывод, что вирус Зика, нарушая плазматическую мембрану эмбриональных опухолевых клеток ЦНС, индуцирует гибель клеток. Все эмбриональные опухолевые клетки, выделенные из ЦНС, генерировали репродукцию вирусных частиц в высоких титрах начиная с 24 ч после заражения. Было отмечено, что через 72 ч эти клетки продуцировали уже неполноценные вирионы [35].

Заключение

Вирус Зика может инфицировать стволовые клетки, что приводит к аномальной дифференцировке и порокам развития головного мозга на ранних сроках эмбриогенеза [36].

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Fagbami A.H. Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. *J. Hyg. (Lond)*. 1979; 83(2): 213-9.
DOI: <http://doi.org/10.1017/s0022172400025997>
2. Filipe A.R., Martins C.M.V., Rocha H. Laboratory infection with Zika virus after vaccination against yellow fever. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 1973; 43(4): 315-9.
DOI: <http://doi.org/10.1007/bf01556147>

3. Moore D.L., Causey O.R., Carey D.E., Reddy S., Cooke A.R., Akinkugbe F.M., et al. Arthropod-borne viral infections of man in Nigeria, 1964–1970. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1975; 69(1): 49-64.
DOI: <http://doi.org/10.1080/00034983.1975.11686983>
4. Olson J.G., Ksiazek T.G., Suhandiman, Triwibowo. Zika virus, a cause of fever in central Java, Indonesia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1981; 75(3): 389-93.
DOI: [http://doi.org/10.1016/0035-9203\(81\)90100-0](http://doi.org/10.1016/0035-9203(81)90100-0)
5. Simpson D.I. Zika virus infection in man. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1964; 58: 335-8.
6. Duffy M.R., Chen T.H., Hancock W.T., Powers A.M., Kool J.L., Lanciotti R.S., et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360(24): 2536-43.
DOI: <http://doi.org/10.1056/NEJMoa0805715>
7. Faye O., Freire C.C., Iamarino A., Faye O., de Oliveira J.V., Diallo M., et al. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20th century. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 2014; 8(1): e2636.
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002636>
8. Carreaux G., Maquart M., Bedet A., Contou D., Brugières P., Fourati S., et al. Zika virus associated with meningoencephalitis. *N. Engl. J. Med.* 2016; 374(16): 1595-6.
DOI: <http://doi.org/10.1056/NEJMc1602964>
9. Craig A.T., Butler M.T., Pastore R., Paterson B.J., Durrheim D.N. Acute flaccid paralysis incidence and Zika virus surveillance, Pacific Islands. *Bull. World Health Organ.* 2017; 95(1): 69-75.
DOI: <http://doi.org/10.2471/BLT.16.171892>
10. Parra B., Lizarazo J., Jiménez-Arango J.A., Zea-Vera A.F., González-Manrique G., Vargas J., et al. Guillain-Barré syndrome associated with Zika virus infection in Colombia. *N. Engl. J. Med.* 2016; 375(16): 1513-23.
DOI: <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1605564>
11. Chibueze E.C., Tirado V., Lopes K.D., Balogun O.O., Takemoto Y., Swa T., et al. Zika virus infection in pregnancy: a systematic review of disease course and complications. *Reprod. Health.* 2017; 14(1): 28.
DOI: <http://doi.org/10.1186/s12978-017-0285-6>
12. Mlakar J., Korva M., Tul N., Popović M., Poljšak-Prijatelj M., Mraz J., et al. Zika virus associated with microcephaly. *N. Engl. J. Med.* 2016; 374(10): 951-8.
DOI: <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1600651>
13. Rasmussen S.A., Jamieson D.J., Honein M.A., Petersen L.R. Zika virus and birth defects — reviewing the evidence for causality. *N. Engl. J. Med.* 2016; 374(20): 1981-7.
DOI: <http://doi.org/10.1056/NEJMs1604338>
14. Brasil P., Pereira J.P., Moreira M.E., Ribeiro Nogueira R.M., Damasceno L., Wakimoto M., et al. Zika virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro. *N. Engl. J. Med.* 2016; 375(24): 2321-34.
DOI: <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1602412>
15. Himmelsbach K., Hildt E. Identification of various cell culture models for the study of Zika virus. *World J. Virol.* 2018; 7(1): 10-20.
DOI: <http://doi.org/10.5501/wjv.v7.i1.10>
16. Chan J.F., Yip C.C., Tsang J.O., Tee K.M., Cai J.P., Chik K.K., et al. Differential cell line susceptibility to the emerging Zika virus: implications for disease pathogenesis, non-vector-borne human transmission and animal reservoirs. *Emerg. Microbes Infect.* 2016; 5: e93.
DOI: <http://doi.org/10.1038/emi.2016.99>
17. Ramos da Silva S., Cheng F., Huang I.C., Jung J.U., Gao S.J. Efficiencies and kinetics of infection in different cell types/lines by African and Asian strains of Zika virus. *J. Med. Virol.* 2019; 91(2): 179-89.
DOI: <http://doi.org/10.1002/jmv.25306>
18. Barr K.L., Anderson B.D., Prakoso D., Long M.T. Working with Zika and Usutu viruses *in vitro*. *PLoS neglected tropical diseases.* *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(8): e0004931.
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004931>
19. Vicenti I., Boccutto A., Giannini A., Dragoni F., Saladini F., Zazzi M. Comparative analysis of different cell systems for Zika virus (ZIKV) propagation and evaluation of anti-ZIKV compounds *in vitro*. *Virus Res.* 2018; 244: 64-70.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.11.003>
20. Willard K.A., Demakovskiy L., Tesla B., Goodfellow F.T., Stice S.L., Murdock C.C., et al. Zika virus exhibits lineage-specific phenotypes in cell culture, in aedes aegypti mosquitoes, and in an embryo model. *Viruses.* 2017; 9(12): 383.
DOI: <http://doi.org/10.3390/v9120383>
21. Kumar A., Jovel J., Lopez-Orozco J., Limonta D., Airo A.M., Hou S., et al. Human Sertoli cells support high levels of Zika virus replication and persistence. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 5477.
DOI: <http://doi.org/10.1038/s41598-018-23899-x>
22. Kumar A., Hou S., Airo A.M., Limonta D., Mancinelli V., Branton W., et al. Zika virus inhibits type-I interferon production and downstream signaling. *EMBO Rep.* 2016; 17(12): 1766-75.
DOI: <http://doi.org/10.15252/embr.201642627>
23. Ma W., Li S., Ma S., Jia L., Zhang F., Zhang Y., et al. Zika virus causes testis damage and leads to male infertility in mice. *Cell.* 2017; 168(3): 542.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.009>
24. Duggal N.K., Ritter J.M., Pestorius S.E., Zaki S.R., Davis B.S., Chang G.J., et al. Frequent Zika virus sexual transmission and prolonged viral RNA shedding in an immunodeficient mouse model. *Cell Rep.* 2017; 18(7): 1751-60.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.056>
25. Hirsch A.J., Smith J.L., Haese N.N., Broeckel R.M., Parkins C.J., Kreklywich C., et al. Zika Virus infection of rhesus macaques leads to viral persistence in multiple tissues. *PLoS Pathog.* 2017; 13(4): e1006317.
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006317>
26. Siemann D.N., Strange D.P., Maharaj P.N., Shi P.Y., Verma S. Zika virus infects human Sertoli cells and modulates the integrity of the *in vitro* blood-testis barrier model. *J. Virol.* 2017; 91(22): pii: e00623-17.
DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.00623-17>
27. Uraki R., Hwang J., Jurado K.A., Householder S., Yockey L.J., Hastings A.K., et al. Zika virus causes testicular atrophy. *Sci. Adv.* 2017; 3(2): e1602899.
DOI: <http://doi.org/10.1126/sciadv.1602899>
28. Spencer J.L., Lahon A., Tran L.L., Arya R.P., Kneubehl A.R., Vogt M.B., et al. Replication of Zika virus in human prostate cells: a potential source of sexually transmitted virus. *J. Infect. Dis.* 2018; 217(4): 538-47.
DOI: <http://doi.org/10.1093/infdis/jix436>
29. Kim W., Barron D.A., San Martin R., Chan K.S., Tran L.L., Yang F., et al. RUNX1 is essential for mesenchymal stem cell proliferation and myofibroblast differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2014; 111(46): 16389-94.
DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.1407097111>
30. Lahon A., Arya R.P., Kneubehl A.R., Vogt M.B., Dailey Garnes N.J., Rico-Hesse R., et al. Characterization of a Zika virus isolate from Colombia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(9): e0005019.
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005019>
31. Murray K.O., Gorchakov R., Carlson A.R., Berry R., Lai L., Natrajan M., et al. Prolonged detection of Zika virus in vaginal secretions and whole blood. *Emerg. Infect. Dis.* 2017; 23(1): 99-101.
DOI: <http://doi.org/10.3201/eid2301.161394>
32. Arsuaga M., Bujalance S.G., Díaz-Menéndez M., Vázquez A., Arribas J.R. Probable sexual transmission of Zika virus from a vasectomised man. *Lancet Infect. Dis.* 2016; 16(10): 1107.
DOI: [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30320-6](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30320-6)

33. Froeschl G., Huber K., von Sonnenburg F., Nothdurft H.D., Bretzel G., Hoelscher M., et al. Long-term kinetics of Zika virus RNA and antibodies in body fluids of a vasectomized traveller returning from Martinique: a case report. *BMC Infect Dis.* 2017; 17(1): 55.
DOI: <http://doi.org/10.1186/s12879-016-2123-9>
34. Atkinson B., Thorburn F., Petridou C., Bailey D., Hewson R., Simpson A.J., et al. Presence and persistence of Zika virus RNA in semen, United Kingdom, 2016. *Emerg. Infect. Dis.* 2017; 23(4): 611-5.
DOI: <http://doi.org/10.3201/eid2304.161692>
35. Kaid C., Goulart E., Caires-Júnior L.C., Araujo B.H.S., Soares-Schanoski A., Bueno H.M.S., et al. Zika virus selectively kills aggressive human embryonal CNS tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 2018; 78(12): 3363-74.
DOI: <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-3201>
36. El Costa H., Gouilly J., Mansuy J.M., Chen Q., Levy C., Cartron G., et al. ZIKA virus reveals broad tissue and cell tropism during the first trimester of pregnancy. *Sci. Rep.* 2016; 6: 35296.
DOI: <http://doi.org/10.1038/srep35296>

Информация об авторах:

Пименова Екатерина Владимировна[✉] — к.м.н., с.н.с. лаб. иммунодиагностики ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, 400131, Волгоград, Россия; доц. каф. молекулярной биологии и генетики ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет», 400131, Волгоград, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8632-203X>.
E-mail: ekaterina-304@mail.ru

Храпова Наталья Петровна — д.м.н., проф., г.н.с. лаб. иммунодиагностики ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, 400131, Волгоград, Россия; проф. каф. молекулярной биологии и генетики ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет», 400131, Волгоград, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9782-6866>.
E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Замарина Татьяна Валерьевна — к.м.н., с.н.с. лаб. иммунодиагностики ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, 400131, Волгоград, Россия; доц. каф. молекулярной биологии и генетики ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет», 400131, Волгоград, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2965-0555>.
E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Information about the authors:

Ekaterina V. Pimenova[✉] — PhD (Med.), senior researcher, Laboratory of immunodiagnosics, Volgograd Research Anti-Plague Institute, 400131, Volgograd, Russia; Assoc. Prof., Department of molecular biology and genetics, Volgograd State Medical University, 400131, Volgograd, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8632-203X>.
E-mail: ekaterina-304@mail.ru

Natalya P. Khrapova — D. Sci. (Med.), Prof., principal researcher, Laboratory of immunodiagnosics, Volgograd Research Anti-Plague Institute, 400131, Volgograd, Russia; Prof., Department of molecular biology and genetics, Volgograd State Medical University, 400131, Volgograd, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9782-6866>.
E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Tatyana V. Zamarina — PhD (Med.), senior researcher, Laboratory of immunodiagnosics, Volgograd Research Anti-Plague Institute, 400131, Volgograd, Russia; Assoc. Prof., Department of molecular biology and genetics, Volgograd State Medical University, 400131, Volgograd, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2965-0555>.
E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Contribution: the authors contributed equally to this article.



Экологические особенности персистенции холерных вибрионов: ретроспективный анализ и современное состояние проблемы

Меньшикова Е.А.✉, Курбатова Е.М., Титова С.В.

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, 344002, Ростов-на-Дону, Россия

В обзоре представлены ретроспективные данные о 6 пандемиях холеры и современные представления о возбудителе 7-й пандемии *V. cholerae* El Tor, вызвавшем пандемическое распространение инфекции с формированием истинных стойких и временных промежуточных эндемичных очагов, обеспечивающих самое длительное в истории существование болезни. Одно из возможных объяснений такого длительного течения пандемии холеры связано с чрезвычайно высокой пластичностью генома и развитием ряда приспособительных реакций, которые позволяют холерным вибрионам адаптироваться и сохраняться в окружающей среде. С развитием молекулярно-генетических методов исследования установлена способность холерных вибрионов к формированию биопленки, что повышает стрессоустойчивость, возможность распространения путем прикрепления к абиотическим (пластик) и биотическим субстратам (зоо- и фитопланктон). Образование биопленки также непосредственно связано с преодолением антагонистического действия представителей водных экосистем. Еще одной стратегией выживания холерных вибрионов является переход в некультивируемое состояние, обеспечивающий низкий уровень гибели популяции. Приведены данные литературы о возможном влиянии повышения температуры вследствие изменения климата на вспышки холеры в Африке (Демократическая Республика Конго, Нигерия, Ангола, Зимбабве, Сьерра-Леоне), Юго-Восточной Азии (Таиланд, Малайзия), Центральной Азии (Пакистан, Афганистан, Казахстан) и Южной Азии (Непал). На основании публикаций последних лет дан анализ современного состояния изучаемой проблемы на территории Российской Федерации и, в частности, в Ростовской области.

Ключевые слова: холера; холерный вибрион; персистенция микроорганизмов; биопленка; абиотические и биотические субстраты; некультивируемые формы; температура.

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

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

Для цитирования: Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М., Титова С.В. Экологические особенности персистенции холерных вибрионов: ретроспективный анализ и современное состояние проблемы. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(2): 165–173.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-165-173>

Поступила 30.12.2019
Принята в печать 20.02.2020

Ecological features of the persistence of *Vibrio cholerae*: retrospective analysis and actual state of the problem

Elena A. Menshikova✉, Ekaterina M. Kurbatova, Svetlana V. Titova

Rostov-on-Don Antiplague Institute, 344002, Rostov-on-Don, Russia

The review presents retrospective data on six cholera pandemics and current views on the causative agent of the seventh pandemic *V. cholerae* El Tor, which caused a pandemic infection with the formation of true persistent and temporary intermediate endemic foci that provided the longest pathogen circulation in the history of the disease. One of the possible explanations for such a long course of the cholera pandemic is associated with an extremely high variability of the genome and the development of a number of adaptive reactions that allow cholera vibrios to adapt and remain in the environment. Due to the development of molecular genetic research methods, the ability of cholera vibrios to form biofilms which increases stress resistance, the ability to spread by attachment to abiotic (plastic) and biotic substrates (zooplankton and phytoplankton) has been discovered. Biofilm formation is also directly related to overcoming the antagonistic action of members of aquatic ecosystems. Another strategy for the survival of cholera vibrios is the transition to an uncultured state that proves a low level of death in the population. Published data on the possible effects of temperature increasing due to the climate change on cholera outbreaks in Africa (Democratic Republic of the Congo, Nigeria, Angola, Zimbabwe, Sierra Leone), Southeast Asia (Thailand, Malaysia), Central Asia (Pakistan, Afghanistan, Kazakhstan) and South Asia (Nepal) are overviewed. Based

on the publications of recent years, an analysis is made of the current state of the studied problem in the Russian Federation and, in particular, in the Rostov region.

Keywords: cholera; cholera vibrio; persistence of microorganisms; biofilm; abiotic and biotic substrates; non-cultivated forms; temperature.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

For citation: Menshikova E.A., Kurbatova E.M., Titova S.V. Ecological features of the persistence of *Vibrio cholerae*: retrospective analysis and actual state of the problem. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(2): 165–173. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-165-173>

Received 30 December 2019

Accepted 20 February 2020

Введение

Первые упоминания о холере восходят к временам Гиппократ и Будды, а может быть, и более ранним. Современная история холеры началась в 1817 г. В этот период была зарегистрирована вспышка эпидемии в Индии, которая впоследствии распространилась по всему Индийскому континенту и была определена как первая пандемия холеры в Юго-Восточной Азии. В течение XIX в. зарегистрировано 6 пандемий холеры, закончившихся в 1923 г. и распространившихся в основном в странах, расположенных в Южном полушарии, а также в Европе и Северной Америке [1]. До настоящего времени не дошли сведения, каким возбудителем были вызваны первые 4 пандемии, тогда как 5-я и 6-я были вызваны *Vibrio cholerae* O1 серогруппы классического биовара. В 1961 г. в Индонезии началась 7-я пандемия, которая затем распространилась на Индийский субконтинент и Ближний Восток, а в 1970-х гг. переместилась в Африку и в начале 1990-х годов достигла Южной Америки [2–4]. Эта пандемия холеры, которая продолжается уже более полувека, отличается от предшествующих новым видом возбудителя, который вызывает трудно диагностируемые стертые клинические формы и большое количество вибрионосительства, что обуславливает широкое распространение заболевания на все обитаемые континенты земного шара с формированием временных промежуточных и истинных стойких эндемичных очагов, обеспечивающих самое продолжительное в истории существование болезни [5]. Вспышки холеры имели место в Карибском бассейне, Южной Америке, Африке, Южной Азии и на Ближнем Востоке. Хотя о случаях холеры часто не сообщается, по оценкам ВОЗ, в мире ежегодно регистрируется 3–5 млн случаев заболевания [6–10].

С 1992 г. с появлением нового возбудителя — холерного вибриона (ХВ) O139 серогруппы (штамм Бенгал), вызвавшего случаи заболевания в ряде стран Азии, ситуация по холере осложнилась. Современный период 7-й пандемии холеры обусловлен в основном генетически измененными вариан-

тами *V. cholerae* El Tor, продуцирующими токсин классического биовара ХВ с более тяжелым клиническим течением заболевания и высокими показателями летальности [4–9].

Существует множество гипотез о причинах такого длительного течения пандемии. Одни авторы утверждают, что это связано с чрезвычайно высокой пластичностью генома и развитием ряда приспособительных реакций, которые позволяют ХВ адаптироваться и сохраняться в окружающей среде, переживать стрессовые факторы, такие как недостаток питательных веществ, колебания солености воды и температуры, необходимость защиты от хищных гетеротрофных протистов и бактериофагов. Одна из стратегий выживания ХВ — это формирование биопленки, которое ассоциируется с повышенной стрессоустойчивостью, расширением доступа к питательным веществам и использованием ее в качестве среды для распространения, когда возбудитель холеры прикрепляется к живым мобильным хозяевам [10].

Основная часть

M. Sultana и соавт. [11], проводя исследования поверхностных водоемов, пришли к выводу, что биопленки являются средством персистенции и неотъемлемой частью годового жизненного цикла ХВ в Бангладеш. Проводя мониторинг поверхностных водоемов в течение года, авторы установили, что в весенне-летний период ХВ находятся в планктонной форме, и это совпадает с ежегодными сезонными вспышками холеры в данном регионе. В межэпидемический период ХВ сохраняются в форме биопленки, прикрепленные к планктону или другим субстратам, а также в некультивируемой форме (НФ) [11]. Переход от свободного плавания к прикрепленному образу жизни [12, 13] усиливает природную компетентность и горизонтальный перенос генов [14], а также обеспечивает повышенную защиту от хищников [15]. Одним из наиболее экологически важных субстратов является хитин. *V. cholerae*, как и большинство представителей семейства *Vibrionaceae*, — хитиноподобный микроорганизм. Он обладает несколькими консерватив-

ными генами, продукты которых позволяют бактерии прикрепляться к хитину и разлагать его [16, 17]. Одним из них является N-ацетилглюкозамин (GlcNAc/NAG) — наиболее распространенный органический полимер в природе и отличный источник углерода для бактерий [18]. В связывании *V. cholerae* с хитином участвует GlcNAc-связывающий белок (GbpA) [19, 20], а также маннозочувствительный гемагглютинин (MSHA), который представляет собой пили IV типа [21]. Кроме того, токсинорегулируемые пили (TCP), являющиеся фактором колонизации кишечного эпителия человека, играют определенную роль в ассоциации с хитином. TCP необходимы для дифференциации прикрепленной биопленки, т.к. у недифференцированной биопленки в отсутствие TCP снижается степень экологической адаптации за счет того, что она менее эффективно разлагает хитин [22].

После первоначального прикрепления к поверхности ХВ формируют «матричные, поверхностно-связанные сообщества», или биопленку. Образование биопленки *V. cholerae* усиливается мобильными пилиями IV типа, жгутиками и продукцией матрикса биопленки, *Vibrio*-полисахарида (VPS) [12]. VPS участвует в иммобилизации клеток, формировании микроколоний и созревании биопленки [23, 24]. Высокий и низкий уровень продукции VPS определяет типы колонии — ругозный и гладкий соответственно, причем ругозный тип обладает более сильным защитным механизмом по отношению к различным стрессам, в том числе к хлору [25–27], низкому pH, осмотическому и оксидативному стрессу, антибактериальной сыворотке, додецилсульфату натрия, фагам и гетеротрофным протистам. Важность VPS для защиты ХВ в окружающей среде пока изучена слабо, опубликовано несколько работ о распространении ругозных ХВ в зависимости от различных экологических факторов окружающей среды [28–30].

В современном мире существует новая проблема — повсеместное использование искусственных полимеров (около 35 кг пластиковых отходов приходится на каждого человека ежегодно). В связи с этим огромное количество пластиковых отходов попадает в воды Мирового океана. Такой объем пластиковых отходов способен изменить экологию водных микробиоценозов. В 2013 г. E.R. Zettler и соавт. ввели новый термин — пластисфера — для обозначения глобального масштаба этой проблемы [31]. Недавние исследования позволили ориентировочно оценить степень загрязнения Мирового океана. По данным 24 экспедиций, проведенных в субтропических регионах в 2007–2013 гг., в морях и океанах плавает приблизительно 4,5 трлн фрагментов пластика различного размера суммарной массой свыше 250 тыс. тонн. Установлены зоны морей и океанов, содержащие повышенное количество раз-

личных плавающих форм пластикового мусора, переносимых океаническими течениями [32].

Исследования последних лет показали, что ХВ O1 и O139 серогрупп, содержащие ген холерного токсина, не только способны адгезироваться на поверхности пластикового мусора, но и в составе биопленок устойчивы к ингибирующей активности штаммов-конкурентов (нетоксигенных вибрионов и других гетерологичных микроорганизмов) [33]. Учитывая способность токсигенных ХВ формировать биопленку на поверхности пластикового мусора даже в присутствии штаммов конкурентной микрофлоры, можно предположить, что плавающие пластиковые фрагменты (пластисфера) в морях и океанах в дополнение к уже изученным факторам могут служить для формирования новой экологической ниши, в которой ХВ не только сохранятся, но и распространятся водами Мирового океана в новые регионы с вероятностью формирования эндемичных очагов холеры [34].

Еще одним адаптационным механизмом *V. cholerae*, направленным на переживание неблагоприятных условий и повышение экологической пластичности, является конверсия бактерий в жизнеспособное, но некультивируемое состояние [35].

В отличие от клеток, испытывающих необходимость в каком-либо компоненте среды, клетки НФ не растут на искусственных питательных средах, которые обычно используют для роста, часто они меньше в размерах, но остаются метаболически активными [36]. Факторы, вызывающие переход *V. cholerae* в НФ, включают перепады температуры и солености, а также отсутствие питательных веществ. ХВ в НФ были обнаружены на поверхности ракообразных и водорослей в планктоне и бентосе, присоединенными к кладке яиц хирономид, а также взвешенными в бактериопланктоне. Важность состояния НФ в эпидемиологии холеры была показана A. Mishra и соавт. [37], в исследованиях которых вирулентность и способность к колонизации сохранялись ХВ в НФ, инкубированными в пресноводных микроекосмах. Существует множество условий, которые вызывают переход ХВ в НФ, однако имеются и многочисленные факторы, благодаря которым происходит полное восстановление функции роста, например повышение температуры или увеличение количества питательных веществ [37].

Экспериментально установлено, что кворум-сенсинг (QS) — это регулятор перехода в НФ. Показано, что переход ХВ в НФ предполагает формирование биопленки, регулируемой QS. В соответствии с этими результатами клетки НФ из поверхностных вод в Бангладеш были восстановлены с помощью природных или химически синтезированных аутоиндукторов QS. После 4–5 ч пребывания в средах с добавлением аутоиндукторов

показатели колониеобразующих единиц были высокими [38]. Некоторые клетки в состоянии покоя сообщества случайным образом пробуждаются «от спячки» и при благоприятных условиях растут [38, 39]. Возможно, эти восстановленные клетки можно сравнить с «разведчиками», проверяющими условия окружающей среды. Если экологические факторы не соответствуют благоприятным условиям для размножения клеток ХВ, то «разведчики» гибнут, т.е. погибает лишь небольшая доля популяции. Однако если условия благоприятны, то генофонд усиливается и поддерживается. Таким образом, НФ являются стратегией, обеспечивающей низкий уровень гибели популяции, что позволяет бактериям долго оставаться в состоянии покоя в окружающей среде [38] и потенциально полностью восстановиться при получении соответствующего сигнала после проверки среды отдельными клетками, чтобы впоследствии расти при благоприятных условиях [39].

Другая версия такого длительного течения 7-й пандемии связана с изменением климата. Объединенной межправительственной группой климатологов зарегистрировано повышение средней температуры воздуха над поверхностью суши и океана на 0,85°C (0,65–1,06°C) за период с 1880 по 2012 г. К концу XXI в. (2081–2100 гг.) ожидается, что средняя температура на планете может увеличиться на 1,5°C (относительно 1850 г.), что приведет к повышению уровня Мирового океана на 1 мм в год в течение XXI в. [40, 41]. Повышенная температура влияет на связь ХВ с хитиновым зоопланктоном. При температуре выше 15°C присоединение к хитину значительно возрастает за счет повышения экспрессии MSHA-пилей и фактора колонизации GbpA [20]. М. Blokesch и соавт. [42] экспериментально показали, что рост *V. cholerae* на поверхности хитина индуцирует способность к естественной трансформации для внутривидового генного обмена. Колебания температуры из-за сезонных изменений на эндемичных территориях могут приводить к увеличению минерализации рек и эстуариев, что приводит к увеличению числа случаев заболеваемости холерой [43]. В природных водоемах важными факторами для перехода *V. cholerae* non-O1 в O1 серогруппу являются физиологическое состояние клеток, температура и соленость [44].

Экспериментально доказано, что гиперосмотический стресс в сочетании с повышенными температурами роста (выше 30°C) увеличивает продукцию защитного пигмента меланина, который обеспечивает устойчивость ХВ к ультрафиолету [45, 46].

Аномально жаркой погодой вследствие изменения климата также объясняют вспышки холеры в Непале, Пакистане, Таиланде, Афганистане, Малайзии, Сьерра-Леоне, Демократической Республике Конго, Нигерии, Анголе, Зимбабве и Казахстане [47, 48]. После сильного землетрясения на Гаити

произошел занос холеры с последующим развитием эпидемии. В период, предшествовавший заносу, средняя температура воздуха и количество осадков значительно превышали средние значения для этого региона, в результате чего произошло массовое развитие фито- и зоопланктона, которые участвуют в сохранении, распространении и эволюционных перестройках ХВ в окружающей среде [49]. Кроме того, массовые заболевания холерой на Гаити, а также в странах Африки и Азии вызваны генетически измененными (атипичными) ХВ с повышенной вирулентностью и высоким эпидемическим потенциалом, которые постепенно вытеснили типичные штаммы практически во всех регионах мира [6, 50–53].

Основное отличие генетически измененных (атипичных) штаммов возбудителя холеры состоит в повышенном уровне вирулентности, что выражается в тяжелых клинических формах болезни, часто с летальным исходом. Различия в вирулентности между типичными и генетически измененными штаммами прежде всего связаны с разным уровнем продукции ими ключевого фактора вирулентности — холерного токсина, вызывающего развитие острой профузной диареи и состоящего из 1 субъединицы А и 5 субъединиц В. Повышение в 2–10 раз продукции холерного токсина у генетически измененных штаммов по сравнению с типичными обусловлено особенностями структуры и функции их профага СТХφ, несущего гены *ctxAB*, кодирующие холерный токсин. У типичных штаммов в нуклеотидной последовательности гена *ctxB*, кодирующего В-субъединицу холерного токсина, присутствует тимин (Т) в позициях 115 и 203, тогда как у генетически измененных — цитозин (С), что характерно для классического биовара *V. cholerae* — возбудителя предыдущих пандемий азиатской холеры. Считается, что в результате горизонтального переноса генов от *V. cholerae* классического биовара в клетки типичных штаммов *V. cholerae* биовара E1 Тог возникли высоковирулентные генетически измененные штаммы. Впервые такие штаммы были выделены в Бангладеш в 1991–1994 гг. от больных во время эпидемии холеры [54]. К настоящему времени для генетически измененных штаммов возбудителя характерно глобальное распространение в мире. Появление атипичных штаммов, возможно, также связано с повышением температуры воды в связи с изменением климата.

На территории России эпидосложнения по холере за период 7-й пандемии характеризовались заносами инфекции без последующего распространения возбудителя [55], однако температура на территории России за последние 100 лет из-за глобального потепления повышалась в 1,5–2 раза быстрее, чем в других уголках планеты. По прогнозам Гидрометцентра России, основная часть страны в XXI в.

«будет находиться в области более значительного потепления»; по оценкам в 2017 г., «средняя мировая скорость потепления климата — 0,17 градуса за 10 лет. На европейской территории России эта скорость в 3 раза больше и достигает 0,54 градуса за 10 лет». Таким образом, уже через 20 лет средняя температура в средней полосе может вырасти более чем на 1°C [56].

При анализе многолетних данных по мониторингу контаминации ХВ поверхностных водоемов отмечено, что наибольшее количество штаммов различной эпидзначимости было выделено в Южном федеральном округе, а по количеству выделенных штаммов ХВ из рек Темерник и Дон Ростовская область заняла 2-е место [57]. Сотрудники Ростовского противочумного института при проведении ретроспективного анализа влияния температуры на выделение ХВ за 2013–2017 гг. установили, что в Ростове-на-Дону в реке Дон наблюдается тенденция к увеличению амплитуды колебаний среднесезонной температуры, что, в свою очередь, приводит к увеличению процента высеваемости культур ХВ non-O1/non-O139 серогрупп. Кроме того, отмечено обнаружение штаммов ХВ O1 серогруппы (токсигенных и нетоксигенных) в таком же температурном диапазоне, что и *V. cholerae* non-O1/non-O139 [58].

Заключение

На основании приведенных данных можно предположить, что повышение температуры воды в реках Ростовской области вследствие изменения климата может привести к накоплению возбудителя в случае его заноса с эндемичных по холере территорий, что свидетельствует о необходимости дальнейшего изучения влияния температуры воды поверхностных водоемов на циркуляцию ХВ для своевременной оценки эпидемиологической обстановки по холере [58].

Таким образом, холера не может быть искоренена, поскольку ХВ являются аутохтонной микрофлорой водных экосистем на эндемичных территориях и проявляют высокую степень генетической variability, которая поддерживает резистентность ХВ к нагрузке окружающей среды и последующую персистенцию. Способность ХВ образовывать биопленку на поверхности биотических и абиотических субстратов даже в присутствии конкурентной микрофлоры может служить основой для сохранения и переноса возбудителя в новые регионы с вероятностью формирования новых очагов холеры. В связи с повышением температуры вследствие глобального изменения климата и появления генетически измененных штаммов на фоне неблагоприятного прогноза по холере в мире область распространения возбудителя может расшириться за пределы эндемичных очагов, что спо-

собствует повышению риска заражения людей. Это свидетельствует о необходимости целенаправленного слежения за циркуляцией ХВ в объектах окружающей среды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Blake P.A., Wachsmuth K.I., Olsik O. Historical perspectives on pandemic cholera. In: *Vibrio cholerae and Cholera: Molecular to Global Perspectives*. Washington: American Society for Microbiology Press; 1994: 293-5.
2. Ломов Ю.М., Онищенко Г.Г., Москвитина Э.А., Подосиникова Л.С. Характеристика современного этапа в развитии 7 пандемии холеры. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1997; (6): 39-42.
3. Марамович А.С., Урбанович Л.Я., Куликалова Е.С., Шкаруба Т.Т. Роль и значение поверхностных водоемов в становлении и развитии VII пандемии. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2009; (2): 21-6.
4. Bik E.M., Bunschoten A.E., Gouw R.D., Mooi F.R. Genesis of the novel epidemic *Vibrio cholerae* O139 strain: evidence for horizontal transfer of genes involved in polysaccharide synthesis. *EMBO J*. 1995; 14(2): 209-16.
DOI: <http://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb06993.x>
5. Faruque S.M., Albert M., Mekalanos J.J. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol. Mol. Rev.* 1998; 62(4): 1301-14.
6. Смирнова Н.И., Агафонов Д.А., Кульшань Т.А., Краснов Я.М., Кутырев В.В. Микроэволюция возбудителя холеры в современный период. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2014; 69(7-8): 46-53.
DOI: <http://doi.org/10.15690/vramn.v69i7-8.1109>
7. Москвитина Э.А., Мазрухо А.Б., Арешина О.А., Адаменко О.Л., Назаретян А.А., Анисимова Г.Б. Эпидемиологические особенности холеры на современном этапе седьмой пандемии. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2014; 19(4): 44-9.
8. Москвитина Э.А., Адаменко О.Л., Кругликов В.Д., Титова С.В., Монахова Е.В., Писанов Р.В. и др. Холера: эпидемиологическая обстановка в мире в 2005–2014 гг. Прогноз на 2015 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015; (1): 18-25.
9. Онищенко Г.Г., Москвитина Э.А., Кругликов В.Д., Титова С.В., Адаменко О.Л., Водопьянов А.С. и др. Эпидемиологический надзор за холерой в России в период седьмой пандемии. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2015; 70(2): 249-56.
DOI: <http://doi.org/10.15690/vramn.v70i2.1320>
10. Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004; 2(2): 95-108.
DOI: <http://doi.org/10.1038/nrmicro821>
11. Sultana M., Nusrin S., Hasan N.A., Sadique A., Ahmed K.U., Islam A., et al. Biofilms comprise a component of the annual cycle of *Vibrio cholerae* in the Bay of Bengal estuary. *mBio*. 2018; 9(2): pii: e00483-18.
DOI: <http://doi.org/10.1128/mBio.00483-18>
12. Yildiz F.H., Visick K.L. *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. *Trends Microbiol.* 2009; 17(3): 109-18.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.tim.2008.12.004>
13. Srivastava D., Waters M. A tangled web: regulatory connections between quorum sensing and cyclic di-GMP. *J. Bacteriol.* 2012; 194(17): 4485-93.
DOI: <http://doi.org/10.1128/JB.00379-12>
14. Lo Scudato M., Blokesch M. The regulatory network of natural competence and transformation of *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet.* 2012; 8(6): e1002778.
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002778>

15. Matz C., Kjelleberg S. Off the hook — how bacteria survive protozoan grazing. *Trends Microbiol.* 2005; 13(7): 302-7.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.tim.2005.05.009>
16. Meibom K.L., Li X.B., Nielsen A.T., Wu C.Y., Roseman S., Schoolnik G.K. The *Vibrio cholerae* chitin utilization program. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; (101): 2524-9.
DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.0308707101>
17. Hunt D.E., Gevers D., Vahora N.M., Polz M.F. Conservation of the chitin utilization pathway in the Vibrionaceae. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008; 74(1): 44-51.
DOI: <http://doi.org/10.1128/AEM.01412-07>
18. Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog. Polym.* 2006; 31(7): 603-32.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
19. Kim T.J., Jude B.A., Taylor R.K. A colonization factor links *Vibrio cholerae* environmental survival and human infection. *Nature.* 2005; 438(7069): 863-6.
DOI: <http://doi.org/10.1038/nature04249>
20. Stauder M., Vezzulli L., Pezzati E., Repetto B., Pruzzo C. Temperature affects *Vibrio cholerae* O1 El Tor persistence in the aquatic environment via an enhanced expression of GbpA and MSHA adhesions. *Microbiol. Rep.* 2010; 2(1): 140-4.
DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00121.x>
21. Chiavelli D.A., Marsh J.W., Taylor R.K. The mannose-sensitive hemagglutinin of *Vibrio cholerae* promotes adherence to zooplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67(7): 3220-5.
DOI: <http://doi.org/10.1128/AEM.67.7.3220-3225.2001>
22. Reguera G., Kolter R. Virulence and the environment: a novel role for *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pili in biofilm formation on chitin. *J. Bacteriol.* 2005; 187(10): 3551-5.
DOI: <http://doi.org/10.1128/JB.187.10.3551-3555.2005>
23. Watnick P.I., Kolter R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol. Microbiol.* 1999; 34(3): 586-95.
DOI: <http://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01624.x>
24. Watnick P.I., Lauriano C.M., Klose K.E., Croal L., Kolter R. The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. *Mol. Microbiol.* 2001; 39(2): 223-35.
DOI: <http://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02195.x>
25. Fong J.C., Karplus K., Schoolnik G.K., Yildiz F.H. Identification and characterization of RbmA, a novel protein required for the development of rugose colony morphology and biofilm structure in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2006; 188(3): 1049-59.
DOI: <http://doi.org/10.1128/JB.188.3.1049-1059>
26. Morris J.G., Sztein M.B., Rice E.W., Nataro J.P., Losonsky G.A., Panigrahi P., et al. *Vibrio cholerae* O1 can assume a chlorine-resistant rugose survival form that is virulent for humans. *J. Infect. Dis.* 1996; 174(6): 1364-8.
DOI: <http://doi.org/10.1093/infdis/174.6.1364>
27. Yildiz F.H., Schoolnik G.K. *Vibrio cholerae* O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96(7): 4028-33.
DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.96.7.4028>
28. Wai S.N., Mizunoe Y., Takada A., Kawabata S.I., Yoshida S.I. *Vibrio cholerae* O1 Strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 64(10): 3648-55.
29. Sun S., Kjelleberg S., McDougald D. Relative contributions of *Vibrio* polysaccharide and quorum sensing to the resistance of *Vibrio cholerae* to predation by heterotrophic protists. *PLoS One.* 2013; 8(2): e56338.
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0056338>
30. Ali A., Rashid M.H., Karaolis D.K. High-frequency rugose exopolysaccharide production by *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002; 68(11): 5773-8.
DOI: <http://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5773-5778.2002>
31. Zettler E.R., Mincer T.J., Amaral-Zettler L.A. Life in the «plastisphere»: microbial communities on plastic marine debris. *Environ. Sci. Technol.* 2013; 47(13): 7137-46.
DOI: <http://doi.org/10.1021/es401288x>
32. Eriksen M., Lebreton L.C.M., Carson H.S., Thiel M., Moore C.J., Borerro J.C., et al. Plastic pollution in the world's oceans: more than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 tons afloat at sea. *PLoS One.* 2013; 9(12): e111913.
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0111913>
33. Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Олейников И.П., Лысова Л.К., Титова С.В. Анализ внутривидовой конкуренции штаммов *Vibrio cholerae* с помощью INDEL-маркеров. *Здоровье населения и среда обитания.* 2016; (4): 35-8.
34. Водопьянов С.О., Титова С.В., Водопьянов А.С., Олейников И.П., Клешнина О.В., Москвитина Э.А. Пластисфера как возможный фактор глобального распространения *V. cholerae* (материал для подготовки лекции). *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение.* 2018; 7(3): 109-13.
DOI: <http://doi.org/10.24411/2305-3496-2018-13016>
35. Colwell R.R. Viable but nonculturable bacteria: a survival strategy. *J. Infect. Chemother.* 2006; 6(2): 121-5.
DOI: <http://doi.org/10.1007/PL00012151>
36. Oliver J.D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 2010; 34(4): 415-25.
DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x>
37. Mishra A., Taneja N., Sharma M. Viability kinetics, induction, resuscitation and quantitative real-time polymerase chain reaction analyses of viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in freshwater microcosm. *J. Appl. Microbiol.* 2012; 112(5): 945-53.
DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05255>
38. Bari S.M.N., Roky M.K., Mohiuddin M., Kamruzzaman M., Mekalanos J.J., Faruque S.M. Quorum-sensing autoinducers resuscitate dormant *Vibrio cholerae* in environmental water samples. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013; 110(24): 9926-31.
DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.1307697110>
39. Buerger S., Spoering A., Gavriš E., Leslin C., Ling L., Epstein S.S. Microbial scout hypothesis, stochastic exit from dormancy, and the nature of slow growers. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012; 78(9): 3221-8.
DOI: <http://doi.org/10.1128/AEM.07307-11>
40. Lipp E.K., Huq A., Colwell R.R. Effects of global climate on infectious disease: the cholera model. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15(4): 757-70.
DOI: <http://doi.org/10.1128/cmr.15.4.757-770.2002>
41. Core Writing Team; Pachauri R.K., Meyer L.A., eds. Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Geneva: IPCC; 2014.
42. Blokesch M., Schoolnik G.K. Serogroup conversion of *Vibrio cholerae* in aquatic reservoirs. *PLoS Pathog.* 2007; 3(6): e81.
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030081>
43. Shikuma N.J., Yildiz F.N. Identification and characterization of OscR, transcriptional regulator involved in osmolarity adaptation in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2009; 191(13): 4082-96.
DOI: <http://doi.org/10.1128/JB.01540-08>
44. Montilla R., Chowdhury M.A., Huq A., et al. Serogroup conversion *Vibrio cholerae* non-O1 to *Vibrio cholerae* O1: effect of growth cells, temperature, and salinity. *Can. J. Microbiol.* 1996; 42(1): 87-93.
DOI: <http://doi.org/10.1139/m96-014>
45. Coyne V.E., Al-Harthi L. Induction of melanin biosynthesis in *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992; 58(9): 2861-5.
46. Valeru S.P., Rompikuntal P.K., Ishikawa T., Vaitkevicius K., Sjöling A., Dolganov N., et al. Role of melanin pigment in expression of *Vibrio cholerae* virulence factors. *Infect. Immun.* 2009; 77(3): 935-42.
DOI: <http://doi.org/10.1128/IAI.00929-08>

47. Jueterbock A., Tyberghein L., Verbruggen H., Coyer J.A., Olsen J.L., Hoarau G. Climate change impact on seaweed meadow distribution in the North Atlantic rocky intertidal. *Ecol. Evol.* 2013; 3(5): 1356-73.
 DOI: <http://doi.org/10.1002/ece3.541>
 48. Mutreja A., Kim D.W., Thomson N.R., Connor T.R., Lee J.H., Kariuki S., et al. Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic. *Nature.* 2011; 477(7365): 462-5.
 DOI: <http://doi.org/10.1038/nature10392>
 49. Марков Е.Ю., Куликалова Е.С., Урбанович Л.Я., Вишняков В.С., Балахонов С.В. Хитин и продукты его гидролиза в экологии *Vibrio cholerae* (обзор). *Биохимия.* 2015; 80(9): 1334-43.
 DOI: <http://doi.org/10.1134/S0006297915090023>
 50. Chin C.S., Sorenson J., Harris J.B., Robins W.P., Charles R.C., Jean-Charles R.R., et al. The origin of the Haitian cholera outbreak strain. *Engl. J. Med.* 2011; 364(1): 33-42.
 DOI: <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1012928>
 51. Савельев В.Н., Савельева И.В., Бабенышев Б.В., Куличенко А.Н. Эволюция возбудителя и клинико-эпидемиологические особенности современной холеры Эль-Тор. *Эпидемиология и инфекционные болезни.* 2012; (5): 31-5.
 52. Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Кутырев В.В., Смирнова Н.И., Щербакова С.А., Москвитина Э.А. и др. Актуальные проблемы эпидемиологического надзора, лабораторной диагностики и профилактики холеры в Российской Федерации. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2016; (1): 89-101.
 53. Son M.S., Megli C.J., Kovacicova G., Qadri F., Taylor R.K. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype variant clinical isolates from Bangladesh and Haiti, including a molecular genetic analysis of virulence genes. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49(11): 3739-49.
 DOI: <http://doi.org/10.1128/JCM.01286-11>
 54. Москвитина Э.А., Тюленева Е.Г., Самородова А.В., Кругликов В.Д., Титова С.В., Иванова С.М. и др. Эпидемиологическая обстановка по холере в мире и России в 2007–2016 гг., прогноз на 2017 г. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2017; (1): 13-20.
 DOI: <http://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-1-13-20>
 55. Титова С.В., Кругликов В.Д., Ежова М.И., Водопьянов А.С., Архангельская И.В., Водопьянов С.О. и др. Анализ динамики выделения и биологических свойств штаммов *V. cholerae* O1 El-Tor, изолированных из водных объектов на территории Ростовской области в 2003–2014 гг. *Здоровье населения и среда обитания.* 2015; (2): 39-41.
 56. Русская семерка. Рошепий И. Каким будет климат в средней полосе России через 20 лет. Available at: <https://russian7.ru/post/kakim-budet-klimat-v-sredney-polose-ro/>
 57. Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Ежова М.И., Москвитина Э.А., Титова С.В. Анализ результатов мониторинга холерных вибрионов в объектах окружающей среды на административных территориях России с помощью ГИС «Холера 1989–2014». *Проблемы особо опасных инфекций.* 2017; (4): 99-102.
 DOI: <http://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-4-99-102>
 58. Меньшикова Е.А., Архангельская И.В., Левченко Д.А., Курбатова Е.М., Кругликов В.Д., Титова С.В. Влияние температурных флуктуаций воды поверхностных водоемов города Ростова-на-Дону на циркуляцию холерных вибрионов. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова.* 2014; 14(4): 14-20.
- REFERENCES
1. Blake P.A., Wachsmuth K.I., Olsik O. Historical perspectives on pandemic cholera. In: *Vibrio cholerae and Cholera: Molecular to Global Perspectives.* Washington: American Society for Microbiology Press; 1994: 293-5.
 2. Lomov Yu.M., Onishchenko G.G., Moskvitina E.A., Podosinikova L.S. Description of the current stage of development of the 7th cholera pandemic. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 1997; (6): 39-42. (in Russian)
 3. Maramovich A.S., Urbanovich L.Ya., Kulikalova E.S., Shkaruba T.T. Role and significance of shallow water reservoirs in the formation and development of the seventh pandemic of cholera. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni.* 2009; (2): 21-6. (in Russian)
 4. Bik E.M., Bunschoten A.E., Gouw R.D., Mooi F.R. Genesis of the novel epidemic *Vibrio cholerae* O139 strain: evidence for horizontal transfer of genes involved in polysaccharide synthesis. *EMBO J.* 1995; 14(2): 209-16.
 DOI: <http://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb06993.x>
 5. Faruque S.M., Albert M., Mekalanos J.J. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol. Mol. Rev.* 1998; 62(4): 1301-14.
 6. Smirnova N.I., Agafonov D.A., Kul'shan' T.A., Krasnov Ya.M., Kut'yev V.V. Microevolution of cholera agent in the modern period. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk.* 2014; 69(7-8): 46-53.
 DOI: <http://doi.org/10.15690/vramn.v69i7-8.1109> (in Russian)
 7. Moskvitina E.A., Mazrukho A.B., Areshina O.A., Adamenko O.L., Nazaretyan A.A., Anisimova G.B. Epidemiological features of cholera at the present stage of the seventh pandemic. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni.* 2014; 19(4): 44-9. (in Russian)
 8. Moskvitina E.A., Adamenko O.L., Kruglikov V.D., Titova S.V., Monakhova E.V., Pisanov R.V., et al. Cholera: epidemiological situation around the world in 2005–2014, and prognosis for 2015. *Problemy osobo opasnykh infektsiy.* 2015; (1): 18-25. (in Russian)
 9. Onishchenko G.G., Moskvitina E.A., Kruglikov V.D., Titova S.V., Adamenko O.L., Vodop'yanov A.S., et al. Epidemiological surveillance of cholera in Russia during the period of the seventh pandemic. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk.* 2015; 70(2): 249-56.
 DOI: <http://doi.org/10.15690/vramn.v70i2.1320> (in Russian)
 10. Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004; 2(2): 95-108.
 DOI: <http://doi.org/10.1038/nrmicro821>
 11. Sultana M., Nusrin S., Hasan N.A., Sadique A., Ahmed K.U., Islam A., et al. Biofilms comprise a component of the annual cycle of *Vibrio cholerae* in the Bay of Bengal estuary. *mBio.* 2018; 9(2): pii: e00483-18.
 DOI: <http://doi.org/10.1128/mBio.00483-18>
 12. Yildiz F.H., Visick K.L. *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. *Trends Microbiol.* 2009; 17(3): 109-18.
 DOI: <http://doi.org/10.1016/j.tim.2008.12.004>
 13. Srivastava D., Waters M. A tangled web: regulatory connections between quorum sensing and cyclic di-GMP. *J. Bacteriol.* 2012; 194(17): 4485-93.
 DOI: <http://doi.org/10.1128/JB.00379-12>
 14. Lo Scudato M., Blokesch M. The regulatory network of natural competence and transformation of *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet.* 2012; 8(6): e1002778.
 DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002778>
 15. Matz C., Kjelleberg S. Off the hook – how bacteria survive protozoan grazing. *Trends Microbiol.* 2005; 13(7): 302-7.
 DOI: <http://doi.org/10.1016/j.tim.2005.05.009>
 16. Meibom K.L., Li X.B., Nielsen A.T., Wu C.Y., Roseman S., Schoolnik G.K. The *Vibrio cholerae* chitin utilization program. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; (101): 2524-9.
 DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.0308707101>
 17. Hunt D.E., Gevers D., Vahora N.M., Polz M.F. Conservation of the chitin utilization pathway in the Vibrionaceae. *Appl. Envi-*

- ron. *Microbiol.* 2008; 74(1): 44-51.
DOI: <http://doi.org/10.1128/AEM.01412-07>
18. Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog. Polym.* 2006; 31(7): 603-32.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
 19. Kirm T.J., Jude B.A., Taylor R.K. A colonization factor links *Vibrio cholerae* environmental survival and human infection. *Nature.* 2005; 438(7069): 863-6.
DOI: <http://doi.org/10.1038/nature04249>
 20. Stauder M., Vezzulli L., Pezzati E., Repetto B., Pruzzo C. Temperature affects *Vibrio cholerae* O1 El Tor persistence in the aquatic environment via an enhanced expression of GbpA and MSHA adhesions. *Microbiol. Rep.* 2010; 2(1): 140-4.
DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00121.x>
 21. Chiavelli D.A., Marsh J.W., Taylor R.K. The mannose-sensitive hemagglutinin of *Vibrio cholerae* promotes adherence to zooplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67(7): 3220-5.
DOI: <http://doi.org/10.1128/AEM.67.7.3220-3225.2001>
 22. Reguera G., Kolter R. Virulence and the environment: a novel role for *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pili in biofilm formation on chitin. *J. Bacteriol.* 2005; 187(10): 3551-5.
DOI: <http://doi.org/10.1128/JB.187.10.3551-3555.2005>
 23. Watnick P.I., Kolter R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol. Microbiol.* 1999; 34(3): 586-95.
DOI: <http://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01624.x>
 24. Watnick P.I., Lauriano C.M., Klose K.E., Croal L., Kolter R. The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. *Mol. Microbiol.* 2001; 39(2): 223-35.
DOI: <http://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02195.x>
 25. Fong J.C., Karplus K., Schoolnik G.K., Yildiz F.H. Identification and characterization of RbmA, a novel protein required for the development of rugose colony morphology and biofilm structure in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2006; 188(3): 1049-59.
DOI: <http://doi.org/10.1128/JB.188.3.1049-1059>
 26. Morris J.G., Szein M.B., Rice E.W., Nataro J.P., Losonsky G.A., Panigrahi P., et al. *Vibrio cholerae* O1 can assume a chlorine-resistant rugose survival form that is virulent for humans. *J. Infect. Dis.* 1996; 174(6): 1364-8.
DOI: <http://doi.org/10.1093/infdis/174.6.1364>
 27. Yildiz F.H., Schoolnik G.K. *Vibrio cholerae* O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96(7): 4028-33.
DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.96.7.4028>
 28. Wai S.N., Mizunoe Y., Takade A., Kawabata S.I., Yoshida S.I. *Vibrio cholerae* O1 Strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 64(10): 3648-55.
 29. Sun S., Kjelleberg S., McDougald D. Relative contributions of *Vibrio* polysaccharide and quorum sensing to the resistance of *Vibrio cholerae* to predation by heterotrophic protists. *PLoS One.* 2013; 8(2): e56338.
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0056338>
 30. Ali A., Rashid M.H., Karaolis D.K. High-frequency rugose exopolysaccharide production by *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002; 68(11): 5773-8.
DOI: <http://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5773-5778.2002>
 31. Zettler E.R., Mincer T.J., Amaral-Zettler L.A. Life in the «plastisphere»: microbial communities on plastic marine debris. *Environ. Sci. Technol.* 2013; 47(13): 7137-46.
DOI: <http://doi.org/10.1021/es401288x>
 32. Eriksen M., Lebreton L.C.M., Carson H.S., Thiel M., Moore C.J., Borroero J.C., et al. Plastic pollution in the world's oceans: more than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 tons afloat at sea. *PLoS One.* 2013; 9(12): e111913.
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0111913>
 33. Vodop'yanov S.O., Vodop'yanov A.S., Oleynikov I.P., Lysova L.K., Titova S.V. The analysis of intraspecific competition of *vibrio cholerae* strains by means of INDEL-markers. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya.* 2016; (4): 35-8. (in Russian)
 34. Vodop'yanov S.O., Titova S.V., Vodop'yanov A.S., Oleynikov I.P., Kleshnina O.V., Moskvitina E.A. Plasticsfera as a possible factor of global distribution *Vibrio cholerae* (material for the preparation of the lecture). *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie.* 2018; 7(3): 109-13.
DOI: <http://doi.org/10.24411/2305-3496-2018-13016> (in Russian)
 35. Colwell R.R. Viable but nonculturable bacteria: a survival strategy. *J. Infect. Chemother.* 2006; 6(2): 121-5.
DOI: <http://doi.org/10.1007/PL00012151>
 36. Oliver J.D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 2010; 34(4): 415-25.
DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x>
 37. Mishra A., Taneja N., Sharma M. Viability kinetics, induction, resuscitation and quantitative real-time polymerase chain reaction analyses of viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in freshwater microcosm. *J. Appl. Microbiol.* 2012; 112(5): 945-53.
DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05255>
 38. Bari S.M.N., Roky M.K., Mohiuddin M., Kamruzzaman M., Mekalanos J.J., Faruque S.M. Quorum-sensing autoinducers resuscitate dormant *Vibrio cholerae* in environmental water samples. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013; 110(24): 9926-31.
DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.1307697110>
 39. Buerger S., Spoering A., Gavriš E., Leslin C., Ling L., Epstein S.S. Microbial scout hypothesis, stochastic exit from dormancy, and the nature of slow growers. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012; 78(9): 3221-8.
DOI: <http://doi.org/10.1128/AEM.07307-11>
 40. Lipp E.K., Huq A., Colwell R.R. Effects of global climate on infectious disease: the cholera model. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15(4): 757-70.
DOI: <http://doi.org/10.1128/cmr.15.4.757-770.2002>
 41. Core Writing Team; Pachauri R.K., Meyer L.A., eds. Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Geneva: IPCC; 2014.
 42. Blokesch M., Schoolnik G.K. Serogroup conversion of *Vibrio cholerae* in aquatic reservoirs. *PLoS Pathog.* 2007; 3(6): e81.
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030081>
 43. Shikuma N.J., Yildiz F.N. Identification and characterization of OscR, transcriptional regulator involved in osmolarity adaptation in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2009; 191(13): 4082-96.
DOI: <http://doi.org/10.1128/JB.01540-08>
 44. Montilla R., Chowdhury M.A., Huq A., et al. Serogroup conversion *Vibrio cholerae* non-O1 to *Vibrio cholerae* O1: effect of growth cells, temperature, and salinity. *Can. J. Microbiol.* 1996; 42(1): 87-93.
DOI: <http://doi.org/10.1139/m96-014>
 45. Coyne V.E., Al-Harthi L. Induction of melanin biosynthesis in *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992; 58(9): 2861-5.
 46. Valeru S.P., Rompikuntal P.K., Ishikawa T., Vaitkevicius K., Sjöling A., Dolganov N., et al. Role of melanin pigment in expression of *Vibrio cholerae* virulence factors. *Infect. Immun.* 2009; 77(3): 935-42.
DOI: <http://doi.org/10.1128/IAI.00929-08>
 47. Jueterbock A., Tyberghein L., Verbruggen H., Coyer J.A., Olsen J.L., Hoarau G. Climate change impact on seaweed meadow distribution in the North Atlantic rocky intertidal. *Ecol. Evol.* 2013; 3(5): 1356-73.
DOI: <http://doi.org/10.1002/ece3.541>
 48. Mutreja A., Kim D.W., Thomson N.R., Connor T.R., Lee J.H., Kariuki S., et al. Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic. *Nature.* 2011; 477(7365): 462-5.
DOI: <http://doi.org/10.1038/nature10392>

49. Markov E.Yu., Kulikalova E.S., Urbanovich L.Ya., Vishnyakov V.S., Balakhonov S.V. Chitin and products of its hydrolysis in *Vibrio cholerae* ecology. *Biokhimiya*. 2015; 80(9): 1334-43. DOI: <http://doi.org/10.1134/S0006297915090023> (in Russian)
50. Chin C.S., Sorenson J., Harris J.B., Robins W.P., Charles R.C., Jean-Charles R.R., et al. The origin of the Haitian cholera outbreak strain. *Engl. J. Med.* 2011; 364(1): 33-42. DOI: <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1012928>
51. Savel'ev V.N., Savel'eva I.V., Babenyshev B.V., Kulichenko A.N. The evolution of the pathogen and the clinical and epidemiological features of the recent cholera (El Tor). *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni*. 2012; (5): 31-5. (in Russian)
52. Onishchenko G.G., Popova A.Yu., Kutyrev V.V., Smirnova N.I., Shcherbakova S.A., Moskvitina E.A., et al. Actual problems of epidemiologic control, laboratory diagnostics and prophylaxis of cholera in Russian Federation. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2016; (1): 89-101. (in Russian)
53. Son M.S., Megli C.J., Kovacicova G., Qadri F., Taylor R.K. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype variant clinical isolates from Bangladesh and Haiti, including a molecular genetic analysis of virulence genes. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49(11): 3739-49. DOI: <http://doi.org/10.1128/JCM.01286-11>
54. Moskvitina E.A., Tyuleneva E.G., Samorodova A.V., Kruglikov V.D., Titova S.V., Ivanova S.M., et al. Epidemiological situation on cholera across the globe and in the Russian Federation in 2007-2016. Forecast for 2017. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2017; (1): 13-20. DOI: <http://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-1-13-20> (in Russian)
55. Titova S.V., Kruglikov V.D., Ezhova M.I., Vodop'yanov A.S., Arkhangel'skaya I.V., Vodop'yanov S.O., et al. Analysis of isolation dynamics and biological properties of *v.cholerae* o1 el tor strains from water objects on the territory of Rostov region in 2003–2014. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya*. 2015; (2): 39-41. (in Russian)
56. Russkaya semerka. Roshchepiy I. What will be the climate in central Russia in 20 years. Available at: <https://russian7.ru/post/kakim-budet-klimat-v-sredney-polose-ro/> (in Russian)
57. Levchenko D.A., Kruglikov V.D., Arkhangel'skaya I.V., Ezhova M.I., Moskvitina E.A., Titova S.V. Analysis of the results of cholera vibrios monitoring in environmental objects in the administrative territories of the Russian Federation using GIS "Cholera 1989–2014". *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2017; (4): 99-102. DOI: <http://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-4-99-102> (in Russian)
58. Men'shikova E.A., Arkhangel'skaya I.V., Levchenko D.A., Kurbatova E.M., Kruglikov V.D., Titova S.V. Influence of temperature fluctuations of water in surface water bodies of the city of Rostov-on-Don on the circulation of cholera vibrios. *Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im. Yu.A. Ovchinnikova*. 2014; 14(4): 14-20. (in Russian)

Информация об авторах:

Меньшикова Елена Аркадьевна[✉] — к.б.н., с.н.с. лаборатории экологии холерных вибрионов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, 344002, Ростов-на-Дону, Россия.
E-mail: super.monika2007@yandex.ru

Курбатова Екатерина Михайловна — н.с. лаборатории экологии холерных вибрионов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, 344002, Ростов-на-Дону, Россия.

Титова Светлана Викторовна — к.м.н., в.н.с. лаборатории экологии холерных вибрионов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, 344002, Ростов-на-Дону, Россия.
E-mail: titova_sv@antiplague.ru

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Information about the authors:

Elena A. Menshikova[✉] — PhD (Biol.), senior researcher, Laboratory of ecology of cholera vibrios, Rostov-on-Don Antiplague Institute, 344002, Rostov-on-Don, Russia.
E-mail: super.monika2007@yandex.ru

Ekaterina M. Kurbatova — researcher, Laboratory of ecology of cholera vibrios, Rostov-on-Don Antiplague Institute, 344002, Rostov-on-Don, Russia.

Svetlana V. Titova — PhD (Med.), senior researcher, Laboratory of ecology of cholera vibrios, Rostov-on-Don Antiplague Institute, 344002, Rostov-on-Don, Russia.
E-mail: titova_sv@antiplague.ru

Contribution: the authors contributed equally to this article.

ДИСКУССИИ

© Михеева М.А., Михеева И.В., 2020



Динамика рейтинга экономического ущерба от инфекционных болезней как критерий эффективности эпидемиологического контроля

Михеева М.А., Михеева И.В.✉

ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора,
111123, Москва, Россия

Цель: рейтинговая оценка экономической значимости инфекционных болезней в Российской Федерации для анализа эффективности и выбора приоритетных направлений их профилактики.

Материалы и методы. Исходными данными для расчета ежегодного экономического ущерба послужили стандартные величины экономического ущерба от 1 случая инфекционной болезни в Российской Федерации, проиндексированные с учетом уровня инфляции. Сведения о числе случаев инфекционных заболеваний получены из официальной статистической отчетности (формы № 1, 2) за 2009–2019 гг. Ежегодный ущерб от конкретной болезни вычисляли путем умножения стандартной величины ущерба от 1 случая на число случаев, зарегистрированных в данном году. Стоимостные показатели ущерба подвергали рейтинговой оценке.

Результаты. В 2019 г. наибольший экономический ущерб нанесли острые респираторные вирусные инфекции, туберкулез, острые кишечные инфекции, ветряная оспа, ВИЧ-инфекция (впервые выявленные и летальные случаи в 2019 г.). Впервые был подсчитан экономический ущерб от ротавирусной инфекции, который занял 6-е ранговое место. Рейтинговый анализ величин экономического ущерба в 2009–2019 гг. показал наибольшее снижение экономического ущерба от заболеваемости гриппом, краснухой, острым и хроническим вирусным гепатитом В. В то же время прослеживался рост экономического ущерба от кори, коклюша, геморрагических лихорадок и клещевого боррелиоза.

Обсуждение. Продемонстрирована возможность использования динамики рейтинга экономического ущерба в качестве показателя эффективности мер эпидемиологического контроля. Предложенная методика может быть применена в качестве инструмента для определения приоритетов при принятии управленческих решений в области эпидемиологического контроля в условиях ограниченных бюджетных ресурсов системы здравоохранения.

Ключевые слова: экономический ущерб; инфекционные заболевания; Российская Федерация; рейтинговая оценка; эффективность эпидемиологического контроля.

Источник финансирования. Исследование выполнено в рамках бюджетного финансирования НИР ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора.

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

Для цитирования: Михеева М.А., Михеева И.В. Динамика рейтинга экономического ущерба от инфекционных болезней как критерий эффективности эпидемиологического контроля. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2020; 97(2): 174–181.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-174-181>

Поступила 18.03.2020
Принята в печать 29.03.2020

Ranking Dynamics of Economic Burden of Infectious Diseases as a Criterion of Effectiveness of Epidemiologic Control

Marina A. Mikheeva, Irina V. Mikheeva✉

Central Research Institute of Epidemiology, 111123, Moscow, Russia

Purpose: rank-based assessment of the economic impact of infectious diseases in the Russian Federation for the further analysis of effectiveness of their prevention and for prioritization of preventive measures.

Materials and Methods. The annual economic burden was estimated by using inflation-adjusted standard economic costs of one case of infectious disease in the Russian Federation. The data on the number of cases were obtained from the official statistical reports (Forms 1, 2) for 2009–2019. The annual burden of the specific disease was estimated by multiplying the standard cost of 1 case by the number of cases registered within a given year. The economic costs were assessed and ranked.

Results and discussion. In 2019, the greatest economic burden was exerted by acute respiratory infections, tuberculosis, acute gastrointestinal infections, chickenpox, HIV infection (newly diagnosed cases and deaths in 2019). The economic burden of rotavirus infection was assessed and ranked for the first time. The ranking analysis of the economic costs in 2009–2019 showed the largest decrease in the economic burden of influenza, rubella, acute and chronic hepatitis B. At the same time, the economic burden of measles, pertussis, hemorrhagic fevers and tick-borne borreliosis demonstrated an upward trend.

The possibility of using ranking dynamics of economic burden as a performance indicator of epidemiological control has been demonstrated. In response to limited public funding of healthcare, the offered method can be used in setting priorities in decision making in the field of epidemic control.

Keywords: economic burden; infectious diseases; Russian Federation; rank-based assessment; effectiveness of epidemiologic control.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

For citation: Mikheeva M.A., Mikheeva I.V. Ranking dynamics of economic burden of infectious diseases as a criterion of effectiveness of epidemiologic control. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(2): 174–181.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-174-181>

Received 18 March 2020

Accepted 29 March 2020

Введение

В современных условиях реформирования здравоохранения России особое значение приобретает экономический анализ, который способствует принятию управленческих решений для достижения максимального медицинского профилактического эффекта при ограниченных затратах сил и средств. Методология экономического анализа применима к любым медицинским вмешательствам, в том числе к методам профилактики, для определения экономической целесообразности их использования.

К мероприятиям по контролю эпидемического процесса, требующим своевременного исполнения в полном объеме и определяющим эффективность контроля эпидемического процесса отдельно взятых инфекционных болезней, относятся меры по санитарной охране территории Российской Федерации, производственный контроль, введение ограничительных мероприятий (карантина), изоляция больных инфекционными болезнями, дезинфекционные мероприятия, вакцинопрофилактика, проведение медицинских осмотров, гигиеническое воспитание и обучение и др. При разработке профилактических программ разного уровня для выбора целей традиционно пользуются результатами оценки социально-экономической значимости той или иной нозологии.

Для оценки экономической значимости инфекционной патологии И.Л. Шаханиной предложен и адаптирован к условиям России метод, основанный на использовании «стандартных» стоимостных величин экономического ущерба, наносимого

1 случаем заболевания [1–4]. Средневзвешенные величины экономического ущерба от случая инфекционного заболевания достаточно информативны и достоверны и могут служить целям управления здравоохранением [4].

Стоимостные характеристики экономической значимости рассчитываются в соответствии с ГОСТ Р 57525-2017¹, согласно которому «в понятие "стоимость болезни" входят все затраты, связанные с лечением больных с определенным заболеванием как на определенном этапе (отрезке времени), так и на всех этапах оказания медицинской помощи, а также с нетрудоспособностью и преждевременной смертностью». Экономическая значимость болезни выражается в величинах ущерба, наносимого экономике, и измеряется в рублях.

Однако для практики здравоохранения остается проблемой сравнительная оценка величин экономического ущерба от различных болезней в динамике в связи с невозможностью проведения точных подсчетов из-за многообразия объективных и субъективных факторов, влияющих на стоимостные характеристики ущерба от каждой нозологии, а также инфляционных процессов. Трудности с оценкой экономической значимости болезней создают препятствия для выбора оптимальных направлений профилактических программ, на которые следует направить имеющиеся ограниченные ресурсы.

¹ ГОСТ Р 57525-2017 «Клинико-экономические исследования. Общие требования». Дата введения: 2018-06-01.

Целью данного исследования являлась рейтинговая оценка экономической значимости инфекционных болезней в Российской Федерации для анализа эффективности и выбора приоритетных направлений профилактики.

Материалы и методы

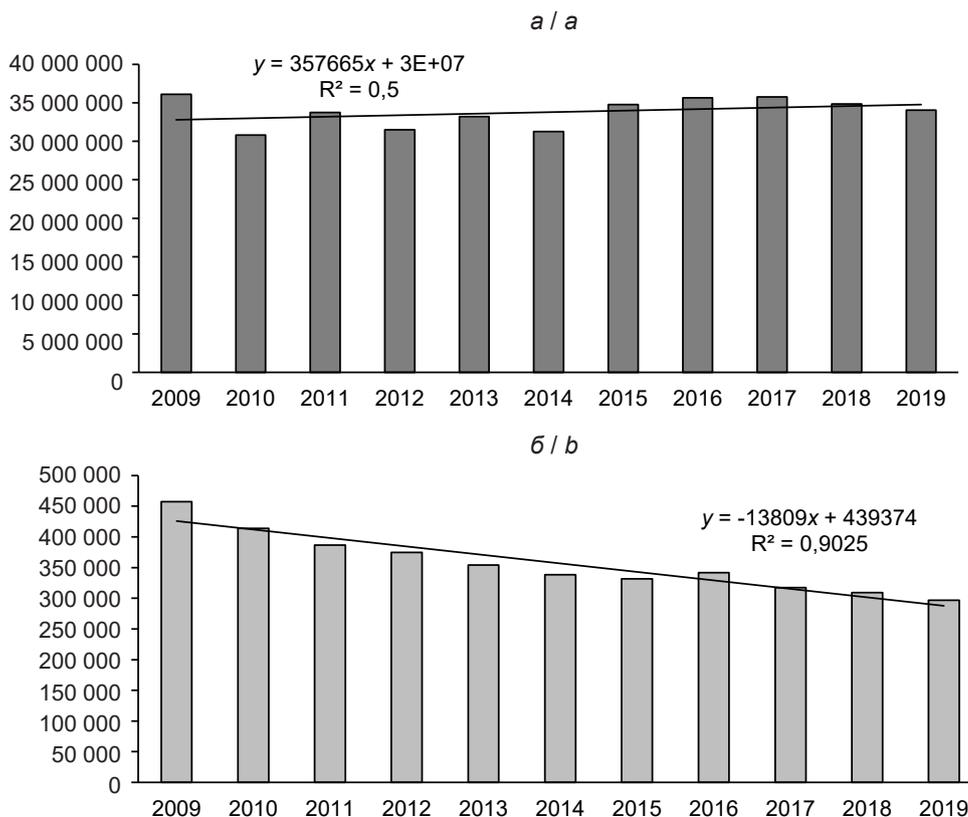
Исходными данными для расчета ежегодного экономического ущерба послужили стандартные величины экономического ущерба от 1 случая инфекционной болезни в России. Большинство стандартных величин ущерба в расчете на 1 средневзвешенный случай инфекционного заболевания опубликованы в работах И.Л. Шаханиной [2, 4]. Величина ущерба от одного случая заболевания рассчитывалась как сумма прямых и непрямых затрат. Оценка прямых затрат включала расчет стоимости лекарственных препаратов, а также амбулаторного и стационарного медицинского обслуживания заболевшего. При этом учитывалась структура клинических форм заболевания по тяжести течения. Непрямой экономический ущерб рассчитывали как размер валового внутреннего продукта, не произведенного вследствие потери рабочего времени (дней и лет) заболевшим или при заболевании ребенка одним из родителей (опекунов). Величины ущерба от случая заболевания туберкулезом [5] и ВИЧ-инфекцией [6] получены из литературных источников, а ущерб от

ротавирусной инфекции [7], коклюша [8], ветряной оспы и опоясывающего лишая [9] рассчитан в ходе собственных исследований.

Все стандартные величины экономического ущерба были проиндексированы с учетом уровня инфляции по данным Росстата. Сведения о числе случаев инфекционных заболеваний получены из официальной статистической отчетности (формы № 1 и 2 Федерального государственного статистического наблюдения за инфекционной заболеваемостью в Российской Федерации) за 2009–2019 гг.

Величину ежегодного ущерба от отдельно взятой инфекционной болезни вычисляли путем умножения стандартной величины экономического ущерба от 1 случая данной болезни на число случаев, зарегистрированных в данном году. В дальнейшем стоимостные показатели ущерба от инфекционных болезней ранжировали от большего к меньшему и подвергали рейтинговой оценке. Впервые эта методика была применена авторами данной статьи при составлении Государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2014 году» и затем регулярно использовалась при издании Государственных докладов Роспотребнадзора в 2015–2018 гг.

В настоящей публикации проанализирована динамика ранговых показателей ущерба от конкретных нозологий за 2009–2019 гг.



Динамика абсолютного числа случаев инфекционных (а) и паразитарных (б) заболеваний в России в 2009–2019 гг.
Dynamics of the absolute number of cases of infectious (a) and parasitic (b) diseases in Russia in 2009–2019.

Результаты

В 2019 г. в России наблюдалось снижение общего числа инфекционных и паразитарных заболеваний на 2,4% по сравнению с 2018 г.: зарегистрировано 34 млн 338 тыс. 157 случаев против 35 млн 166 тыс.

730 случаев в 2018 г. Тенденция роста заболеваемости инфекционными болезнями была выражена слабо, в то время как заболеваемость паразитарными болезнями снизилась в значительной степени (рисунок). В последние 3 года сохранялась устойчи-

Таблица 1. Экономический ущерб от инфекционных болезней в Российской Федерации в 2019 г.
Table 1. Economic burden of infectious diseases in the Russian Federation in 2019

Инфекционные болезни Infectious diseases	Экономический ущерб, тыс. руб. Economic burden, thousand rubles
Острые инфекции верхних дыхательных путей множественной и неуточненной локализации Acute upper respiratory tract infections of multiple and unspecified sites	518 428 786,5
Туберкулез (впервые выявленный), активные формы Tuberculosis (newly diagnosed cases), active forms	32 562 991,4
Ветряная оспа / Chickenpox	28 999 139,7
Острые кишечные инфекции, вызванные неустановленными инфекционными возбудителями, пищевые токсикоинфекции неустановленной этиологии Acute gastrointestinal infections caused by unidentified pathogens, foodborne toxin-mediated infections of unknown etiology	15 858 048,5
Болезнь, вызванная вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), и бессимптомный инфекционный статус, вызванный ВИЧ (впервые выявленные случаи) Human immunodeficiency virus (HIV) disease and asymptomatic HIV infection status (newly diagnosed cases)	10 562 626,4
Ротавирусная инфекция / Rotavirus infection	8 431 262,1
Острые кишечные инфекции, вызванные установленными бактериальными, вирусными возбудителями, а также пищевые токсикоинфекции установленной этиологии Acute gastrointestinal infections caused by identified bacterial and viral pathogens as well as foodborne toxin-mediated infections of known etiology	8 242 993,7
Укусы, ослонения, оцарапывания животными Exposure to infected animal bites, saliva and scratches	4 163 413,7
Инфекционный мононуклеоз / Infectious mononucleosis	4 144 779,7
Сальмонеллез / Salmonellosis	2 502 405,5
Педикулез / Pediculosis	1 932 728,5
Вирусные лихорадки, передаваемые членистоногими, и вирусные геморрагические лихорадки Arthropod-borne viral fevers and viral hemorrhagic fevers	1 829 268,6
Хронический вирусный гепатит С (впервые установленный) Chronic hepatitis C (newly diagnosed cases)	1 792 327,7
Грипп / Influenza	1 600 608,5
Клещевой боррелиоз / Lyme disease	1 092 414,9
Коклюш, паракоклюш / Pertussis, parapertussis	859 826,0
Скарлатина / Scarlet fever	742 375,4
Вирусный гепатит А / Hepatitis A	576 216,2
Бактериальная дизентерия (шигеллез) / Bacillary dysentery (shigellosis)	470 647,6
«Носительство» возбудителя вирусного гепатита В (впервые выявленное) HBV carrier state (newly diagnosed cases)	464 971,5
Менингококковая инфекция / Meningococcal disease	372 485,2
Корь / Measles	284 766,7
Острый вирусный гепатит С / Acute hepatitis C	255 266,5
Острый вирусный гепатит В / Acute hepatitis B	198 896,9
Бруцеллез, впервые выявленный / Brucellosis, new cases	128 338,7
Эпидемический паротит / Epidemic parotitis (mumps)	32 307,6
Псевдотуберкулез / Pseudotuberculosis	32 289,5
Лептоспироз / Leptospirosis	12 860,7
Туляремия / Tularemia	8 097,2

Таблица 1 / Table 1.

Инфекционные болезни Infectious diseases	Экономический ущерб, тыс. руб. Economic burden, thousand rubles
Столбняк / Tetanus	2 011,1
Брюшной тиф / Typhoid fever	1 978,0
Краснуха / Rubella	1 280,3
Дифтерия / Diphtheria	1 277,6
Паратифы А, В, С и неуточненный / Paratyphoid fevers A, B, C and unspecified	329,7
Бактерионосители брюшного тифа, паратифов / Typhoid and paratyphoid bacteria carriers	329,7
Бактерионосители токсигенных штаммов дифтерии / Carriers of diphtheria toxigenic strains	305,8
Итого Total	646 590 653,3

вая тенденция снижения заболеваемости как инфекционными, так и паразитарными болезнями.

Согласно проведенным расчетам, экономический ущерб лишь от 36 инфекционных болезней превысил 646 млрд руб. (табл. 1). Предотвращенный в результате снижения заболеваемости некоторыми инфекциями экономический ущерб по сравнению с 2018 г. составил около 3,56 млрд руб. Однако за счет увеличения числа случаев заболевания некоторыми нозологиями экономический ущерб возрос более чем на 7 млрд руб. Абсолютные стоимостные показатели общего экономического ущерба, нанесенного инфекционными болезнями в 2019 г., по сравнению с предыдущим годом возросли на 1,4%. С учетом индекса инфляции, который, по данным Росстата², составил в 2019 г. 3%, общий ущерб от инфекционных заболеваний снизился на 1,6%.

Как и в течение всего периода с 2014 г., в 2019 г. наибольший экономический ущерб нанесли острые респираторные вирусные инфекции, туберкулез, острые кишечные инфекции, ветряная оспа, ВИЧ-инфекция (впервые выявленные и летальные случаи в 2019 г.). Впервые был выделен из общей суммы экономических потерь от кишечных инфекций с установленным возбудителем и подсчитан ущерб от ротавирусной инфекции, который занял 6-е ранговое место. В число нозологий с наибольшим экономическим ущербом в 2019 г. вошли также укусы и ослюнения животными, инфекционный мононуклеоз, сальмонеллезы и педикулез.

Результаты рейтингового анализа величин экономического ущерба, нанесенного инфекционными болезнями в 2009–2019 гг. (табл. 2), продемонстрировали наибольшее снижение экономического ущерба от заболеваемости гриппом (со 2-й до 11-й позиции), краснухой (с 25-й до 30-й), острым вирусным гепатитом В (с 17-й до 21-й) и «носительства» вируса гепатита В (фактически — заболеваемости

хроническим гепатитом В) (с 12-й до 17-й), а также заболеваемости острым вирусным гепатитом А (с 11-й до 15-й) и шигеллезами (с 13-й до 16-й).

В то же время прослеживается рост экономического ущерба от кори (с 29-й до 19-й позиции), коклюша (с 22-й до 13-й). Повысилась экономическая значимость геморрагических лихорадок (с 14-й до 9-й позиции) и клещевого боррелиоза (с 16-й до 12-й).

По сравнению с 2018 г. в 2019 г. снизился рейтинг экономического ущерба от острого и хронического вирусного гепатита С (на 1 и 2 пункта соответственно), скарлатины, клещевого боррелиоза, дифтерии, туляремии (на 1 пункт). Возрос рейтинг экономического ущерба от геморрагических лихорадок (на 3 пункта), кори (на 2), коклюша (на 1).

Обсуждение

Предложенная методика ранжирования величин экономического ущерба позволила провести сравнение не только экономических потерь от различных болезней, но и сопоставить величины ущерба от каждой нозологии в течение 10 лет. Анализ изменения рейтинга инфекционной болезни предоставил возможность судить о том, насколько эффективными были меры борьбы с данной патологией в течение десятилетия. Как и прогнозировалось, наибольшее снижение экономического ущерба достигнуто в отношении инфекций, управляемых вакцинацией, — гриппа (со 2-го до 11-го рангового места), краснухи (рейтинг понизился на 5 пунктов), вирусного гепатита В и А (рейтинг понизился на 4 пункта). Этот факт еще раз подтвердил тезис о вакцинации как о наиболее экономически эффективном методе управления эпидемическим процессом в целом и при краснухе [10] и вирусных гепатитах А [11] и В [12] в частности. Однако в отношении гриппа снижение может объясняться также изменением подходов к регистрации случаев — в отдельные периоды времени учитывались только лабораторно подтвержденные заболевания этой инфекцией [13].

² Федеральная служба государственной статистики.
 URL: <https://www.gks.ru>

Таблица 2. Рейтинги значений экономического ущерба, ассоциированного с инфекционными заболеваниями (за исключением туберкулеза и ВИЧ-инфекции), в 2009–2019 гг. в России

Table 2. Ranking dynamics of economic burden of infectious diseases (exclusive of tuberculosis and HIV infection) in Russia in 2009–2019

Нозологические формы Nosological forms	Рейтинг (максимальный показатель ущерба = 1, минимальный = 33) Ranking (maximum burden = 1, minimum burden = 33)										
	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Острые респираторные вирусные инфекции Acute respiratory infections	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Острые кишечные инфекции неустановленной этиологии Acute gastrointestinal infections of unknown etiology	3	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3
Ветряная оспа / Chickenpox	4	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2
Острые кишечные инфекции установленной этиологии Acute gastrointestinal infections of known etiology	5	4	5	4	4	4	4	4	4	4	4
Укусы животными / Animal bites	6	5	6	5	5	5	5	5	5	6	5
Сальмонеллез / Salmonellosis	7	6	7	6	6	7	7	8	7	7	7
Инфекционный мононуклеоз / Infectious mononucleosis	9	8	8	7	7	6	6	6	6	5	6
Педикулез / Pediculosis	8	9	9	8	9	8	8	9	9	9	8
Хронический вирусный гепатит С / Chronic hepatitis C	10	10	10	9	10	9	9	10	8	8	10
Вирусный гепатит А / Hepatitis A	11	11	15	12	12	10	13	11	11	15	15
Геморрагические лихорадки / Hemorrhagic fevers	14	17	16	15	11	11	11	12	12	12	9
Скарлатина / Scarlet fever	15	14	13	14	15	12	15	16	14	13	14
Носительство вирусного гепатита В / HBV carrier state	12	13	12	11	16	13	14	15	15	17	17
Клещевой боррелиоз / Lyme disease	16	15	11	10	14	14	12	13	13	11	12
Дизентерия (шигеллез) / Dysentery (shigellosis)	13	12	14	13	13	15	16	14	16	16	16
Вирусный гепатит В / Hepatitis B	17	16	17	17	17	16	17	17	18	20	21
Вирусный гепатит С / Hepatitis C	19	19	19	19	19	17	18	18	17	19	20
Грипп / Influenza	2	7	4	16	8	18	10	7	10	10	11
Менингококковая инфекция / Meningococcal disease	18	18	18	18	18	19	21	20	19	18	18
Корь / Measles	29	29	24	22	22	20	24	27	24	21	19
Коклюш, паракоклюш / Pertussis, parapertussis	22	21	20	20	21	21	20	19	20	14	13
Иерсиниозы / Yersinioses	21	20	21	21	23	22	21	21	23	23	22
Бруцеллез / Brucellosis	23	23	22	23	24	23	22	22	22	22	23
Псевдотуберкулез / Pseudotuberculosis	20	22	23	24	25	24	23	23	25	25	25
Лептоспироз / Leptospirosis	24	24	25	26	27	25	26	26	27	27	26
Туляремия / Tularemia	28	25	29	27	20	26	25	25	26	26	27
Эпидемический паротит / Epidemic parotitis	26	28	28	28	28	27	28	24	21	24	24
Тифопаратифозные заболевания Typhoid and paratyphoid diseases	27	27	26	29	26	28	27	28	28	28	28
Краснуха / Rubella	25	26	27	25	29	29	30	30	31	32	30
Столбняк / Tetanus	31	30	32	30	30	30	29	29	29	29	29
Носительство возбудителя дифтерии Diphtheria carrier state	32	31	30	31	31	31	31	31	30	31	32
Дифтерия / Diphtheria	30	32	31	32	32	32	32	32	32	30	31
Болезнь Брилля / Brill-Zinsser disease	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33

Примечание. Цветом обозначены рейтинги:  — 1–5;  — 6–10;  — 11–15;  — 16–20;  — 21–33.

Повышение рейтинга болезни при ранжировании экономического ущерба может свидетельствовать об имеющихся проблемах в борьбе с той или иной инфекцией. Например, рост экономического ущерба от кори (с 29-го до 19-го рангового места) отражает возобновление эндемичной циркуляции вируса кори и увеличение числа непривитых лиц, за счет которых наблюдается рост числа очагов с распространением инфекции³.

Повышение рейтинга экономического ущерба от коклюша (с 22-й до 13-й позиции) может быть связано как с улучшением диагностики инфекции за счет внедрения более чувствительных лабораторных методов, так и с повышением роли детей старшего дошкольного и школьного возраста в распространении коклюша, что требует внедрения второй ревакцинации против этой инфекции в Национальный календарь профилактических прививок [14, 15].

Рост экономической значимости геморрагических лихорадок (с 14-го до 9-го рангового места) и клещевого боррелиоза (с 16-го до 12-го) свидетельствует не только об улучшении лабораторной диагностики этих заболеваний, но и о необходимости усиления мер профилактики трансмиссивных инфекций на фоне изменения климатических условий, активизации хозяйственной деятельности на территории природных очагов, а также уменьшения объемов дезинсекционных мероприятий [16].

«Стандартные» величины средневзвешенного экономического ущерба от 1 случая болезни с течением времени могут уточняться и корректироваться, в том числе с учетом региональных особенностей. Если ранее ряд показателей был рассчитан для группы нозологий, например для острых кишечных инфекций установленной этиологии, то по мере проведения соответствующих расчетов будут уточняться показатели для отдельных инфекций из данной группы. В частности, нами был рассчитан ущерб от 1 случая ротавирусной инфекции [7], что позволило выделить ущерб от этой нозологии из суммы экономических потерь от группы ОКИ с установленным возбудителем.

Несмотря на очевидно неточный и приближительный характер результатов расчетов ущерба на основе «стандартных» величин средневзвешенного экономического ущерба от 1 случая болезни, они позволяют выполнить задачи по выделению приоритетных направлений для планирования профилактических и противоэпидемических мероприятий в отношении болезней, имеющих более высокий рейтинг величины экономического ущерба.

Так, стабильно высокий рейтинг ущерба от ветряной оспы (2–3-я позиция из 33 нозологий в

табл. 2) указывает на настоятельную необходимость оптимизации мер борьбы с этой инфекцией, использования потенциала плановой и экстренной вакцинопрофилактики для управления эпидемическим процессом.

Выводы

1. Динамика рейтинга экономического ущерба от инфекционных болезней может служить показателем эффективности мер эпидемиологического контроля.

2. Предложенная методика может быть использована в качестве инструмента для определения приоритетов при принятии управленческих решений в области эпидемиологического контроля в условиях ограниченных ресурсов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шаханина И.Л., Осипова Л.А., Радута О.И. Экономический анализ в практике санитарно-эпидемиологической службы. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2001; (3): 58-60.
2. Шаханина И.Л., Осипова Л.А. Экономические потери от инфекционной заболеваемости в России: величины и тенденции. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2005; (4): 19-21.
3. Шаханина И.Л., Щуров Д.Г., Игонина Е.П. Экономическая значимость внутрибольничных инфекций новорожденных в Москве. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2010; (3): 11-7.
4. Шаханина И.Л., Ясинский А.А. Экономическая эффективность вакцинопрофилактики. В кн.: Зверев В.В., Хаитов Р.М., ред. *Вакцины и вакцинация. Национальное руководство. Краткое издание*. М.: ГЕОТАР-Медиа; 2014: 34-52.
5. Гельманова И.Е., Земляная Н.А., Едильбаев А.Б., Крук Е.А. Анализ стоимости противотуберкулезных мероприятий, ориентированных на пациента с туберкулезом, в городских амбулаторных условиях. *Туберкулез и болезни легких*. 2016; 94(7): 16-24.
DOI: <http://doi.org/10.21292/2075-1230-2016-94-7-16-24>
6. Барина А.Н., Плавинский С.Л. Оценка стоимости предотвращенного случая ВИЧ-инфекции для упрощенного анализа затратной эффективности профилактических мероприятий. *Медицина*. 2016; 4(4): 13-21.
7. Михеева И.В., Михеева М.А. Оценка прямого экономического ущерба, наносимого ротавирусной инфекцией. *Инфекционные болезни*. 2017; 15(4): 95-9.
DOI: <http://doi.org/10.20953/1729-9225-2017-4-95-99>
8. Михеева И.В., Фомкина Н.Н., Михеева М.А. Современная эпидемиологическая и экономическая характеристика коклюша в Москве. *Журнал инфектологии*. 2019; 11(1): 84-91.
DOI: <http://doi.org/10.22625/2072-6732-2019-11-1-84-91>
9. Афонина Н.М., Михеева И.В. Социально-экономическая значимость инфекционной патологии, обусловленной вирусом Varicella zoster. В кн.: *Материалы XXI Конгресса педиатров России с международным участием «Актуальные проблемы педиатрии»*. М.; 2019.
10. Поздняков А.А., Чернявская О.П. Проявления эпидемического процесса кори и краснухи на современном этапе. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2018; 17(5): 45-53.
DOI: <http://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-5-45-53>
11. Индикова И.Н., Шевцов В.А., Волгин А.Р., Олефир Ю.В., Меркулов В.А., Бондарев В.П. Эпидемиология гепатита А и тактика вакцинопрофилактики. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2015; (4): 11-6.

³ Национальный научно-методический центр по надзору за корью и краснухой.
URL: <http://www.gabrich.ru/measles-center.html>

12. Хантимирова Л.М., Козлова Т.Ю., Постнова Е.Л., Шевцов В.А., Рукавишников А.В. Ретроспективный анализ заболеваемости вирусным гепатитом В населения Российской Федерации с 2013 по 2017 г. в аспекте вакцинопрофилактики. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018; 18(4): 225-35.
DOI: <http://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-4-225-235>
13. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2015 году: Государственный доклад. М.; 2016.
14. Михеева И.В., Салтыкова Т.С., Михеева М.А. Целесообразность и перспективы вакцинопрофилактики коклюша без возрастных ограничений. *Журнал инфектологии*. 2018; 10(4): 14-23.
DOI: <http://doi.org/10.22625/2072-6732-2018-10-4-14-23>
15. Пименова А.С., Борисова О.Ю., Цвиркун О.В., Басов А.А., Алешкин В.А., Афанасьев С.С. и др. Эффективность применения молекулярно-генетической диагностики при обследовании очагов коклюшной инфекции. *Инфекция и иммунитет*. 2017; 7(2): 162-70.
DOI: <http://doi.org/10.15789/2220-7619-2017-2-162-170>
16. Полищук М.В., Здольник Т.Д., Сметанин В.Н. Иксодовые клещевые боррелиозы: современная эпидемиологическая ситуация в регионах центра европейской части России. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. 2017; 25(2): 202-8.
DOI: <http://doi.org/10.23888/PAVLOVJ20172202-208>
7. Mikheeva I.V., Mikheeva M.A. Estimation of direct economic loss related to rotavirus infection. *Infektsionnye bolezni*. 2017; 15(4): 95-9.
DOI: <http://doi.org/10.20953/1729-9225-2017-4-95-99> (in Russian)
8. Mikheeva I.V., Fomkina N.N., Mikheeva M.A. Modern epidemiological and economic characteristics of whooping cough in Moscow. *Zhurnal infektologii*. 2019; 11(1): 84-91.
DOI: <http://doi.org/10.22625/2072-6732-2019-11-1-84-91> (in Russian)
9. Afonina N.M., Mikheeva I.V. The socio-economic importance of the infectious pathology caused by the Varicella zoster virus. In: *Materials of the XXI Congress of Pediatricians of Russia with International Participation «Actual Problems of Pediatrics» [Materialy XXI Kongressa pediatrov Rossii s mezhdunarodnym uchastiem «Aktual'nye problemy pediatrii»]*. Moscow; 2019. (in Russian)
10. Pozdnyakov A.A., Chernyavskaya O.P. Manifestations of the epidemic process of measles and rubella at the present stage. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika*. 2018; 17(5): 45-53.
DOI: <http://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-5-45-53> (in Russian)
11. Indikova I.N., Shevtsov V.A., Volgin A.R., Olefir Yu.V., Merkulov V.A., Bondarev V.P. Epidemiology of hepatitis A and vaccination policy. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie*. 2015; (4): 11-6. (in Russian)
12. Khantimirova L.M., Kozlova T.Yu., Postnova E.L., Shevtsov V.A., Rukavishnikov A.V. Retrospective analysis of viral hepatitis B incidence in Russia from 2013 to 2017 in the context of preventive vaccination. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie*. 2018; 18(4): 225-35.
DOI: <http://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-4-225-235> (in Russian)
13. On the state of the sanitary-epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2015: State report. Moscow; 2016. (in Russian)
14. Mikheeva I.V., Saltykova T.S., Mikheeva M.A. Expediency and prospects of a vaccinal prevention of whooping cough without age restrictions. *Zhurnal infektologii*. 2018; 10(4): 14-23.
DOI: <http://doi.org/10.22625/2072-6732-2018-10-4-14-23> (in Russian)
15. Pimenova A.S., Borisova O.Yu., Tsvirkun O.V., Basov A.A., Aleshkin V.A., Afanas'ev S.S., et al. Efficiency of application of molecular-genetic diagnostics in case of inspection of the schools of a whooping cough. *Infektsiya i immunitet*. 2017; 7(2): 162-70.
DOI: <http://doi.org/10.15789/2220-7619-2017-2-162-170> (in Russian)
16. Polishchuk M.V., Zdol'nik T.D., Smetanin V.N. Ixodes tick-borne borreliosis: modern epidemiological situation in the center of the European part of Russia. *Rossiyskiy mediko-biologicheskii vestnik imeni akademika I.P. Pavlova*. 2017; 25(2): 202-8.
DOI: <http://doi.org/10.23888/PAVLOVJ20172202-208> (in Russian)

REFERENCES

1. Shakhanina I.L., Osipova L.A., Raduto O.I. Economic analysis in the practice of the sanitary-epidemiological service. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 2001; (3): 58-60. (in Russian)
2. Shakhanina I.L., Osipova L.A. Economic losses due to infective diseases in Russia: sizes and trends. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 2005; (4): 19-21. (in Russian)
3. Shakhanina I.L., Shchurov D.G., Igonina E.P. The economic importance of nosocomial neonatal infections in Moscow. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika*. 2010; (3): 11-7. (in Russian)
4. Shakhanina I.L., Yasinskiy A.A. Cost-effectiveness of vaccination. In: Zverev V.V., Khaitov R.M., eds. *Vaccines and Vaccination. National Leadership. Brief Edition [Vaktsiny i vaksinatziya. Natsional'noe rukovodstvo. Kratkoe izdanie]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2014: 34-52. (in Russian)
5. Gel'manova I.E., Zemlyanaya N.A., Edil'baev A.B., Kruk E.A. Cost analysis of tuberculosis control activities centered at the patient and performed on the out-patient basis in the urban settings. *Tuberkulez i bolezni legkikh*. 2016; 94(7): 16-24.
DOI: <http://doi.org/10.21292/2075-1230-2016-94-7-16-24> (in Russian)
6. Barinova A.N., Plavinskiy S.L. Life-time cost of averted HIV infection for simplified cost-effectiveness analysis of preventive interventions. *Meditsina*. 2016; 4(4): 13-21. (in Russian)

Информация об авторах:

Михеева Марина Андреевна — м.н.с. лаб. иммунопрофилактики ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0290-388X>.
E-mail: mma17211@gmail.com

Михеева Ирина Викторовна — д.м.н., проф., зав. лаб. иммунопрофилактики ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора; руководитель Научно-методического центра иммунопрофилактики Роспотребнадзора, 111123, Москва, Россия.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-8736-4007>.
E-mail: irina_mikheeva@mail.ru

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Information about the authors:

Marina A. Mikheeva — junior researcher, Laboratory of immunoprophylaxis, Central Research Institute of Epidemiology, 111123, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0290-388X>.
E-mail: mma17211@gmail.com

Irina V. Mikheeva — D. Sci. (Med.), Prof., Head, Laboratory of immunoprophylaxis, Central Research Institute of Epidemiology; Head, Scientific and Methodological Center of Immunoprophylaxis of Rosпотребнадзор, 111123, Moscow, Russia.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-8736-4007>.
E-mail: irina_mikheeva@mail.ru

Contribution: the authors contributed equally to this article.



Ranking Dynamics of Economic Burden of Infectious Diseases as a Criterion of Effectiveness of Epidemiologic Control

Marina A. Mikheeva, Irina V. Mikheeva[✉]

Central Research Institute of Epidemiology, 111123, Moscow, Russia

Purpose: rank-based assessment of the economic impact of infectious diseases in the Russian Federation for the further analysis of effectiveness of their prevention and for prioritization of preventive measures.

Materials and Methods. The annual economic burden was estimated by using inflation-adjusted standard economic costs of one case of infectious disease in the Russian Federation. The data on the number of cases were obtained from the official statistical reports (Forms 1, 2) for 2009–2019. The annual burden of the specific disease was estimated by multiplying the standard cost of 1 case by the number of cases registered within a given year. The economic costs were assessed and ranked.

Results and discussion. In 2019, the greatest economic burden was exerted by acute respiratory infections, tuberculosis, acute gastrointestinal infections, chickenpox, HIV infection (newly diagnosed cases and deaths in 2019). The economic burden of rotavirus infection was assessed and ranked for the first time. The ranking analysis of the economic costs in 2009–2019 showed the largest decrease in the economic burden of influenza, rubella, acute and chronic hepatitis B. At the same time, the economic burden of measles, pertussis, hemorrhagic fevers and tick-borne borreliosis demonstrated an upward trend.

The possibility of using ranking dynamics of economic burden as a performance indicator of epidemiological control has been demonstrated. In response to limited public funding of healthcare, the offered method can be used in setting priorities in decision making in the field of epidemic control.

Keywords: economic burden; infectious diseases; Russian Federation; rank-based assessment; effectiveness of epidemiologic control.

Acknowledgments. None. No funding to declare.

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

For citation: Mikheeva M.A., Mikheeva I.V. Ranking dynamics of economic burden of infectious diseases as a criterion of effectiveness of epidemiologic surveillance. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(2): 174–181.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-174-181>

Received 18 March 2020

Accepted 29 March 2020

Динамика рейтинга экономического ущерба от инфекционных болезней как критерий эффективности эпидемиологического контроля

Михеева М.А., Михеева И.В.[✉]

ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора,
111123, Москва, Россия

Цель: рейтинговая оценка экономической значимости инфекционных болезней в Российской Федерации для анализа эффективности и выбора приоритетных направлений их профилактики.

Материалы и методы. Исходными данными для расчета ежегодного экономического ущерба послужили стандартные величины экономического ущерба от 1 случая инфекционной болезни в Российской Федерации, проиндексированные с учетом уровня инфляции. Сведения о числе случаев инфекционных заболеваний получены из официальной статистической отчетности (формы № 1, 2) за 2009–2019 гг. Ежегодный ущерб от конкретной болезни вычисляли путем умножения стандартной величины ущерба от 1 случая на число случаев, зарегистрированных в данном году. Стоимостные показатели ущерба подвергали рейтинговой оценке.

Результаты. В 2019 г. наибольший экономический ущерб нанесли острые респираторные вирусные инфекции, туберкулез, острые кишечные инфекции, ветряная оспа, ВИЧ-инфекция (впервые выявленные и летальные случаи в 2019 г.). Впервые был подсчитан экономический ущерб от ротавирусной инфекции,

который занял 6-е ранговое место. Рейтинговый анализ величин экономического ущерба в 2009–2019 гг. показал наибольшее снижение экономического ущерба от заболеваемости гриппом, краснухой, острым и хроническим вирусным гепатитом В. В то же время прослеживался рост экономического ущерба от кори, коклюша, геморрагических лихорадок и клещевого боррелиоза.

Обсуждение. Продемонстрирована возможность использования динамики рейтинга экономического ущерба в качестве показателя эффективности мер эпидемиологического контроля. Предложенная методика может быть использована в качестве инструмента для определения приоритетов при принятии управленческих решений в области эпидемиологического контроля в условиях ограниченных бюджетных ресурсов системы здравоохранения.

Ключевые слова: экономический ущерб; инфекционные заболевания; Российская Федерация; рейтинговая оценка; эффективность эпидемиологического контроля.

Источник финансирования. Исследование выполнено в рамках бюджетного финансирования НИР ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора.

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

Для цитирования: Михеева М.А., Михеева И.В. Динамика рейтинга экономического ущерба от инфекционных болезней как критерий эффективности эпидемиологического контроля. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(2): 174–181.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-174-181>

Поступила 18.03.2020
Принята в печать 29.03.2020

Introduction

Amidst the healthcare reforms unfolding in Russia, the economic analysis comes to the fore, being instrumental in making managerial decisions aimed at achieving maximum effect in disease prevention with limited labor and money resources. The methods of economic analysis can be applied to any healthcare interventions, including prevention techniques, to assess their economic feasibility.

The epidemic control measures, which must be taken in full and on time to prevent any emergence and spread of infectious diseases, include sanitary measures within the Russian Federation, industrial control, restrictive measures (*quarantine*), isolation of patients with infectious diseases, *disinfection measures*, preventive vaccination, regular health exams, hygiene education and training, etc. Data resulting from socio-economic impact assessment of a nosological disease are traditionally used for selecting targets in prevention programs of different levels.

The method based on "standard" economic costs of 1 case was offered and adapted to Russia by I.L. Shakhanina [1–4] for assessment of economic impact of infectious illnesses. Weighted averages of economic burden inflicted by one infectious disease case are quite informative and can serve the purposes of healthcare management [4].

Economic impact is estimated in accordance with GOST R 57525-2017¹, where "the cost of illness includes all the costs related to treatment of patients with a particular disease, both during a particular stage (period of time) and during all stages of medical care, as

well as to disability and premature death". Economic impact of diseases is estimated as burden inflicted on the economy and is measured in rubles.

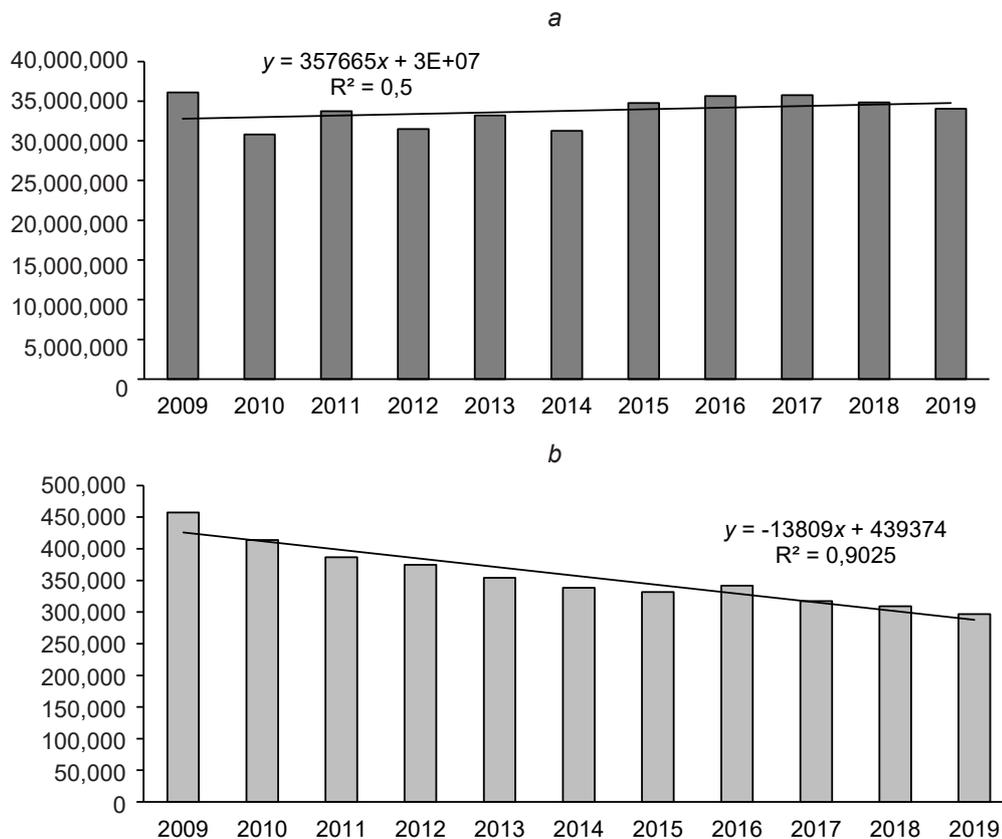
In the meantime, numerous objective and subjective factors that affect economic costs of each disease, including inflation inputs, make it impossible to provide accurate estimates required for comparative assessment of the economic costs of different diseases in their dynamics. Difficulties associated with the assessment of economic impact of diseases impede the possibility to choose the relevant and most efficient preventive programs to channel the available limited resources.

The purpose of this study is to perform rank-based assessment of the economic impact of infectious diseases in the Russian Federation for the further analysis of effectiveness of their prevention and for prioritization of preventive measures.

Materials and Methods

Standard economic costs of one infectious disease case in Russia were used as inputs for estimation of annual economic burden. Most of the standard economic costs per 1 weighted average case of infectious disease are given in publications of I.L. Shakhanina [2, 4]. The economic cost of one disease case was calculated as the sum of direct and indirect costs. The direct costs included the cost of pharmaceuticals, inpatient and outpatient care. The estimation took into account clinical forms broken down by severity. Indirect economic burden was assessed as the gross domestic product unproduced because of labor time (days and years) lost due to an employee's illness or due to the illness of an employee's (acting as a parent or guardian) child. The economic costs of a tuberculosis [5] and *HIV infection* [6] case were obtained from available publications; costs

¹ GOST R 57525-2017 Clinical and Economic Studies. General Requirements. Effective date 2018-06-01.



Dynamics of the absolute number of cases of infectious (a) and parasitic (b) diseases in Russia in 2009–2019.

of rotavirus infection [7], pertussis [8], chickenpox and shingles [9] were calculated during our own studies.

All standard economic costs were adjusted for inflation by using data published by the Russian Federal Statistics Service for the studied time period. The data on the number of cases of infectious diseases were obtained from the publicly available statistical reports (Forms 1 and 2 of the Federal Statistical Monitoring of Infectious Morbidity in the Russian Federation) for 2009–2019.

The annual cost of a single infectious disease was calculated by multiplying the standard economic cost of 1 case of the given disease by the number of cases registered in a particular year. Further on, the economic costs of infectious diseases were ranked in descending order and assessed.

This method was used for the first time by the authors of the article for the State Report on Sanitary and Epidemiologic Well-Being in 2014, and, later on, it was regularly used for state reports of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-Being in 2015–2018.

This article analyzes the dynamics of economic cost rankings for specific diseases in 2009–2019.

Results

In 2019, Russia demonstrated a 2.4% decrease in the total number of infectious and parasitic diseases

as compared to 2018: The number of registered cases was 34,338,157 cases against 35,166,730 cases in 2018. The growth trend in the incidence of infectious diseases was not pronounced, while the incidence of parasitic diseases declined significantly (Figure). The last 3 years were characterized by a steady downward trend in the incidence of infectious and parasitic diseases.

The performed calculations show that the economic burden resulting from as few as 36 infectious diseases exceeded RUB 646 billion (Table 1). The economic burden prevented due to decreased incidence of some infectious diseases amounted to around RUB 3.56 billion as compared to 2018. In the meantime, due to the increased number of cases of some nosological diseases, the economic burden increased by more than RUB 7 billion. The absolute economic costs of infectious diseases increased by 1.4% in 2019 as compared to the previous year. When adjusted for the inflation, which, as reported by the Russian Federal Statistics Service², reached 3% in 2019, the total cost of infectious diseases went down by 1.6%.

Following the trend started in 2014, the most severe economic burden in 2019 was inflicted by acute respiratory infections, tuberculosis, acute gastrointestinal infections, chickenpox, HIV infection (newly diagnosed

Russian Federal Statistics Service. URL: <https://www.gks.ru>

Table 1. Economic burden of infectious diseases in the Russian Federation in 2019

Infectious diseases	Economic burden, thousand rubles
Acute upper respiratory tract infections of multiple and unspecified sites	518 428 786,5
Tuberculosis (newly diagnosed cases), active forms	32 562 991,4
Chickenpox	28 999 139,7
Acute gastrointestinal infections caused by unidentified pathogens, foodborne toxin-mediated infections of unknown etiology	15 858 048,5
Human immunodeficiency virus (HIV) disease and asymptomatic HIV infection status (newly diagnosed cases)	10 562 626,4
Rotavirus infection	8 431 262,1
Acute gastrointestinal infections caused by identified bacterial and viral pathogens as well as foodborne toxin-mediated infections of known etiology	8 242 993,7
Exposure to infected animal bites, saliva and scratches	4 163 413,7
Infectious mononucleosis	4 144 779,7
Salmonellosis	2 502 405,5
Pediculosis	1 932 728,5
Arthropod-borne viral fevers and viral hemorrhagic fevers	1 829 268,6
Chronic hepatitis C (newly diagnosed cases)	1 792 327,7
Influenza	1 600 608,5
Lyme disease	1 092 414,9
Pertussis, parapertussis	859 826,0
Scarlet fever	742 375,4
Hepatitis A	576 216,2
Bacillary dysentery (shigellosis)	470 647,6
HBV carrier state (newly diagnosed cases)	464 971,5
Meningococcal disease	372 485,2
Measles	284 766,7
Acute hepatitis C	255 266,5
Acute hepatitis B	198 896,9
Brucellosis, new cases	128 338,7
Epidemic parotitis (mumps)	32 307,6
Pseudotuberculosis	32 289,5
Leptospirosis	12 860,7
Tularemia	8 097,2
Tetanus	2 011,1
Typhoid fever	1 978,0
Rubella	1 280,3
Diphtheria	1 277,6
Paratyphoid fevers A, B, C and unspecified	329,7
Typhoid and paratyphoid bacteria carriers	329,7
Carriers of diphtheria toxigenic strains	305,8
Total	646 590 653,3

cases and deaths in 2019). For the first time, rotavirus infection was separated out of the group of gastrointestinal infections with identified pathogen, and its economic burden was estimated as ranking sixth. The nosologies characterized by the highest economic burden in 2019 included exposures to animal bites and saliva, infectious mononucleosis, salmonellosis and pediculosis.

The ranking analysis of the economic costs of infectious diseases in 2009–2019 (**Table 2**) demonstrated the largest decrease in the economic burden resulting from influenza (the ranking changed from the 2nd to the 11th ranking position), rubella (from the 25th to the 30th position), acute hepatitis B (from the 17th to the 21st position) and HBV carrier state (actually, chronic hepatitis B) (from the 12th to the 17th position) as well as acute hepatitis A (from ranking 11th to ranking 15th) and shigellosis (from ranking 13th to ranking 16th).

At the same time, the economic burden resulting from measles (down from the 29th position to the 19th position) and pertussis (from ranking 22nd to ranking 13th) showed an upward trend. The upward trend was also observed in the economic impact of *hemorrhagic fevers* (from ranking 14th to ranking 9th) and *Lyme disease* (from ranking 16th to ranking 12th).

As compared to 2018, the ranking results for 2019 showed a decrease in the economic burden of acute and chronic hepatitis C (by 1 and 2 points, respectively), scarlet fever, *Lyme disease*, *diphtheria*, tularemia (by 1 point). The economic burden of the following diseases moved up the ranks: *hemorrhagic fevers* (by 3 points), measles (by 2 points), *pertussis* (by 1 point).

Discussion

The offered method of ranking costs associated with economic burden gave the possibility to compare not only economic losses caused by different diseases, but also to cross-reference the burden imposed by each nosology within 10 years. The analysis of changes in the rankings of infectious diseases made it possible to assess the effectiveness of ten-year-long control measures taken to fight a particular disease. As expected, the largest reduction of economic burden was achieved in vaccine-controllable infectious diseases — influenza (from 2nd to 11th position), rubella (moved down by 5 points), hepatitis B and A (moved down the ranks by 4 points). This fact proves another time that vaccination is the most economically efficient method of epidemic control, in general, and for rubella [10] and hepatitis A [11] and B [12], in particular. As for influenza, the reduction can be also explained by changes in the approaches to case registration — only laboratory-confirmed influenza cases were taken into account during certain time periods [13].

If a disease moves up the ranks in the economic burden ranking list, it may be indicative of existing problems encountered by control measures targeted at a particular infection. For example, the increased eco-

nomical burden of measles (up from the 29th to the 19th ranking position) results from the recurrence of *endemic circulation* of measles virus and the increased number of unvaccinated people who contribute to the growing number of infection sites³.

The higher ranking positions for the economic burden of pertussis (moving up from the 22nd to the 13th position) can be explained by the improved accuracy of infection diagnosis through using more sensitive laboratory techniques and by the increased participation of preschool and school-aged children in spreading of pertussis, thus requiring that the booster vaccination against this infection should be included in the National Immunization Schedule [14, 15].

The increased economic impact of *hemorrhagic fevers* (up from the 14th to the 9th ranking position) and *Lyme disease* (up from the 16th to the 12th position) suggests not only the improved accuracy laboratory diagnostic techniques used for the above diseases, but also signifies the need to strengthen the measures aimed at prevention of transmissible infectious diseases amid changing climate conditions, expanding business activities within natural focal spots and decreasing scope of *disinfestation* measures [16].

The "standard" weighted average economic costs of 1 disease case can be later revised and corrected, taking into account regional specific features, among other things. While previously a number of parameters were estimated for a group of diseases, for example, for acute *gastrointestinal infections of known etiology*, further estimations will give more accurate profiles for individual infections of the given group. For example, we estimated the burden of 1 case of rotavirus infection [7]. Thus, the burden resulting from this disease was singled out of the combined economic losses caused by the group of *acute gastrointestinal infections* with the identified pathogen.

Although the burden estimation based on "standard" weighted average economic costs of 1 disease case is clearly not accurate and very rough, it is highly important for planning and prioritizing preventive and anti-epidemic measures targeted at diseases ranking high in economic burden.

The invariably high ranking of the burden caused by chickenpox (ranking 2nd – 3rd among 33 nosologies in Table 2) emphasizes the urgent need to optimize the infection control, to use the potential of scheduled and emergency preventive vaccination for efficient epidemic control.

Conclusions

1. The ranking dynamics economic burden caused by infectious diseases can serve as an *epidemiological control* performance indicator.

³ The National Scientific and Methodological Center for Supervision over Measles and Rubella.
URL: <http://www.gabrich.ru/measles-center.html>

Table 2. Ranking dynamics of economic burden of infectious diseases (exclusive of tuberculosis and HIV infection) in Russia in 2009–2019

Nosological forms	Ranking (maximum burden = 1, minimum burden = 33)										
	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Acute respiratory infections	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Acute gastrointestinal infections of unknown etiology	3	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3
Chickenpox	4	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2
Acute gastrointestinal infections of known etiology	5	4	5	4	4	4	4	4	4	4	4
Animal bites	6	5	6	5	5	5	5	5	5	6	5
Salmonellosis	7	6	7	6	6	7	7	8	7	7	7
Infectious mononucleosis	9	8	8	7	7	6	6	6	6	5	6
Pediculosis	8	9	9	8	9	8	8	9	9	9	8
Chronic hepatitis C	10	10	10	9	10	9	9	10	8	8	10
Hepatitis A	11	11	15	12	12	10	13	11	11	15	15
Hemorrhagic fevers	14	17	16	15	11	11	11	12	12	12	9
Scarlet fever	15	14	13	14	15	12	15	16	14	13	14
HBV carrier state	12	13	12	11	16	13	14	15	15	17	17
Lyme disease	16	15	11	10	14	14	12	13	13	11	12
Dysentery (shigellosis)	13	12	14	13	13	15	16	14	16	16	16
Hepatitis B	17	16	17	17	17	16	17	17	18	20	21
Hepatitis C	19	19	19	19	19	17	18	18	17	19	20
Influenza	2	7	4	16	8	18	10	7	10	10	11
Meningococcal disease	18	18	18	18	18	19	21	20	19	18	18
Measles	29	29	24	22	22	20	24	27	24	21	19
Pertussis, paraptussis	22	21	20	20	21	21	20	19	20	14	13
Yersiniosis	21	20	21	21	23	22	21	21	23	23	22
Brucellosis	23	23	22	23	24	23	22	22	22	22	23
Pseudotuberculosis	20	22	23	24	25	24	23	23	25	25	25
Leptospirosis	24	24	25	26	27	25	26	26	27	27	26
Tularemia	28	25	29	27	20	26	25	25	26	26	27
Epidemic parotitis	26	28	28	28	28	27	28	24	21	24	24
Typhoid and paratyphoid diseases	27	27	26	29	26	28	27	28	28	28	28
Rubella	25	26	27	25	29	29	30	30	31	32	30
Tetanus	31	30	32	30	30	30	29	29	29	29	29
Diphtheria carrier state	32	31	30	31	31	31	31	31	30	31	32
Diphtheria	30	32	31	32	32	32	32	32	32	30	31
Brill-Zinsser disease	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33

Note. Color codes for rankings: — 1–5; — 6–10; — 11–15; — 16–20; — 21–33.

2. In response to limited public funding of health-care, the offered method can be used in setting priorities for preventive and epidemic control measures.

REFERENCES

1. Shakhanina I.L., Osipova L.A., Raduto O.I. Economic analysis in the practice of the sanitary-epidemiological service. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni*. 2001; (3): 58-60. (in Russian)
2. Shakhanina L.I., Osipova L.A. Economic losses due to infective diseases in Russia: sizes and trends. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni*. 2005; (4): 19-21. (in Russian)
3. Shakhanina I.L., Shchurov D.G., Igonina E.P. The economic importance of nosocomial neonatal infections in Moscow. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika*. 2010; (3): 11-7. (in Russian)
4. Shakhanina I.L., Yasinskiy A.A. Cost-effectiveness of vaccination. In: Zverev V.V., Khaitov R.M., eds. *Vaccines and Vaccination. National Leadership. Brief Edition [Vaksiny i vaksinatziya. Natsional'noe rukovodstvo. Kratkoe izdanie]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2014: 34-52. (in Russian)
5. Gel'manova I.E., Zemlyanaya N.A., Edil'baev A.B., Kruk E.A. Cost analysis of tuberculosis control activities centered at the patient and performed on the out-patient basis in the urban settings. *Tuberkulez i bolezni legkikh*. 2016; 94(7): 16-24. DOI: <http://doi.org/10.21292/2075-1230-2016-94-7-16-24> (in Russian)
6. Barinova A.N., Plavinskiy S.L. Life-time cost of averted HIV infection for simplified cost-effectiveness analysis of preventative interventions. *Medsina*. 2016; 4(4): 13-21. (in Russian)
7. Mikheeva I.V., Mikheeva M.A. Estimation of direct economic loss related to rotavirus infection. *Infeksionnye bolezni*. 2017; 15(4): 95-9. DOI: <http://doi.org/10.20953/1729-9225-2017-4-95-99> (in Russian)
8. Mikheeva I.V., Fomkina N.N., Mikheeva M.A. Modern epidemiological and economic characteristics of whooping cough in Moscow. *Zhurnal infektologii*. 2019; 11(1): 84-91. DOI: <http://doi.org/10.22625/2072-6732-2019-11-1-84-91> (in Russian)
9. Afonina N.M., Mikheeva I.V. The socio-economic importance of the infectious pathology caused by the Varicella zoster virus. In: *Materials of the XXI Congress of Pediatricians of Russia with International Participation «Actual Problems of Pediatrics» [Materialy XXI Kongressa pediatrov Rossii s mezhdunarodnym uchastiem «Aktual'nye problemy pediatrii»]*. Moscow; 2019. (in Russian)
10. Pozdnyakov A.A., Chernyavskaya O.P. Manifestations of the epidemic process of measles and rubella at the present stage. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika*. 2018; 17(5): 45-53. DOI: <http://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-5-45-53> (in Russian)
11. Indikova I.N., Shevtsov V.A., Volgin A.R., Olefir Yu.V., Merkulov V.A., Bondarev V.P. Epidemiology of hepatitis A and vaccination policy. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie*. 2015; (4): 11-6. (in Russian)
12. Khantimirova L.M., Kozlova T.Yu., Postnova E.L., Shevtsov V.A., Rukavishnikov A.V. Retrospective analysis of viral hepatitis B incidence in Russia from 2013 to 2017 in the context of preventive vaccination. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie*. 2018; 18(4): 225-35. DOI: <http://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-4-225-235> (in Russian)
13. On the state of the sanitary-epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2015: State report. Moscow; 2016. (in Russian)
14. Mikheeva I.V., Saltykova T.S., Mikheeva M.A. Expediency and prospects of a vaccinal prevention of whooping cough without age restrictions. *Zhurnal infektologii*. 2018; 10(4): 14-23. DOI: <http://doi.org/10.22625/2072-6732-2018-10-4-14-23> (in Russian)
15. Pimenova A.S., Borisova O.Yu., Tsvirkun O.V., Basov A.A., Aleshkin V.A., Afanas'ev S.S., et al. Efficiency of application of molecular-genetic diagnostics in case of inspection of the schools of a whooping cough. *Infektsiya i immunitet*. 2017; 7(2): 162-70. DOI: <http://doi.org/10.15789/2220-7619-2017-2-162-170> (in Russian)
16. Polishchuk M.V., Zdol'nik T.D., Smetanin V.N. Ixodes tick-borne borrelioses: modern epidemiological situation in the center of the European part of Russia. *Rossiyskiy mediko-biologicheskii vestnik imeni akademika I.P. Pavlova*. 2017; 25(2): 202-8. DOI: <http://doi.org/10.23888/PAVLOVJ20172202-208> (in Russian)

ЛИТЕРАТУРА

1. Шаханина И.Л., Осипова Л.А., Радута О.И. Экономический анализ в практике санитарно-эпидемиологической службы. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2001; (3): 58-60.
2. Шаханина Л.И., Осипова Л.А. Экономические потери от инфекционной заболеваемости в России: величины и тенденции. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2005; (4): 19-21.
3. Шаханина И.Л., Щуров Д.Г., Игонина Е.П. Экономическая значимость внутрибольничных инфекций новорожденных в Москве. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2010; (3): 11-7.
4. Шаханина И.Л., Ясинский А.А. Экономическая эффективность вакцинопрофилактики. В кн.: Зверев В.В., Хаитов Р.М., ред. *Вакцины и вакцинация. Национальное руководство. Краткое издание*. М.: GEOTAR-Media; 2014: 34-52.
5. Гельманова И.Е., Земляная Н.А., Едильбаев А.Б., Крук Е.А. Анализ стоимости противотуберкулезных мероприятий, ориентированных на пациента с туберкулезом, в городских амбулаторных условиях. *Туберкулез и болезни легких*. 2016; 94(7): 16-24. DOI: <http://doi.org/10.21292/2075-1230-2016-94-7-16-24>
6. Баринова А.Н., Плавинский С.Л. Оценка стоимости предотвращенного случая ВИЧ-инфекции для упрощенного анализа затратной эффективности профилактических мероприятий. *Медицина*. 2016; 4(4): 13-21.
7. Михеева И.В., Михеева М.А. Оценка прямого экономического ущерба, наносимого ротавирусной инфекцией. *Инфекционные болезни*. 2017; 15(4): 95-9. DOI: <http://doi.org/10.20953/1729-9225-2017-4-95-99>
8. Михеева И.В., Фомкина Н.Н., Михеева М.А. Современная эпидемиологическая и экономическая характеристика коклюша в Москве. *Журнал инфектологии*. 2019; 11(1): 84-91. DOI: <http://doi.org/10.22625/2072-6732-2019-11-1-84-91>
9. Афонина Н.М., Михеева И.В. Социально-экономическая значимость инфекционной патологии, обусловленной вирусом Varicella zoster. В кн.: *Материалы XXI Конгресса педиатров России с международным участием «Актуальные проблемы педиатрии»*. М.; 2019.
10. Поздняков А.А., Чернявская О.П. Проявления эпидемического процесса кори и краснухи на современном этапе. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2018; 17(5): 45-53. DOI: <http://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-5-45-53>
11. Индикова И.Н., Шевцов В.А., Волгин А.Р., Олефир Ю.В., Меркулов В.А., Бондарев В.П. Эпидемиология гепатита А и тактика вакцинопрофилактики. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2015; (4): 11-6.
12. Хантимирова Л.М., Козлова Т.Ю., Постнова Е.Л., Шевцов В.А., Руквишников А.В. Ретроспективный анализ заболеваемости вирусным гепатитом В населения Российской Федерации с 2013 по 2017 г. в аспекте вакцинопро-

- филактики. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018; 18(4): 225-35.
DOI: <http://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-4-225-235>
13. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2015 году: Государственный доклад. М.; 2016.
14. Михеева И.В., Салтыкова Т.С., Михеева М.А. Целесообразность и перспективы вакцинопрофилактики коклюша без возрастных ограничений. *Журнал инфектологии*. 2018; 10(4): 14-23.
DOI: <http://doi.org/10.22625/2072-6732-2018-10-4-14-23>
15. Пименова А.С., Борисова О.Ю., Цвиркун О.В., Басов А.А., Алешкин В.А., Афанасьев С.С. и др. Эффективность применения молекулярно-генетической диагностики при обследовании очагов коклюшной инфекции. *Инфекция и иммунитет*. 2017; 7(2): 162-70.
DOI: <http://doi.org/10.15789/2220-7619-2017-2-162-170>
16. Полищук М.В., Здольник Т.Д., Сметанин В.Н. Иксодовые клещевые боррелиозы: современная эпидемиологическая ситуация в регионах центра европейской части России. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. 2017; 25(2): 202-8.
DOI: <http://doi.org/10.23888/PAVLOVJ20172202-208>

Information about the authors:

Marina A. Mikheeva — junior researcher, Laboratory of immunoprophylaxis, Central Research Institute of Epidemiology, 111123, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0290-388X>.
E-mail: mma17211@gmail.com

Irina V. Mikheeva — D. Sci. (Med.), Prof., Head, Laboratory of immunoprophylaxis, Central Research Institute of Epidemiology; Head, Scientific and Methodological Center of Immunoprophylaxis of Rospotrebnadzor, 111123, Moscow, Russia.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-8736-4007>.
E-mail: irina_mikheeva@mail.ru

Contribution: the authors contributed equally to this article.

Информация об авторах:

Михеева Марина Андреевна — м.н.с. лаб. иммунопрофилактики ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0290-388X>.
E-mail: mma17211@gmail.com

Михеева Ирина Викторовна — д.м.н., проф., зав. лаб. иммунопрофилактики ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора; руководитель Научно-методического центра иммунопрофилактики Роспотребнадзора, 111123, Москва, Россия.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-8736-4007>.
E-mail: irina_mikheeva@mail.ru

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

НАУКА И ПРАКТИКА

© Игнатъев Г.М., Отрашевская Е.В., Суханова Л.Л.,
Сидоренко Е.С., Нетесова Н.А., 2020



Молекулярно-генетическое исследование штамма Ленинград-16, используемого для производства вакцины кори

Игнатъев Г.М.^{1✉}, Отрашевская Е.В.², Суханова Л.Л.², Сидоренко Е.С.²,
Нетесова Н.А.³

¹ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН», 108819, Москва, Россия;

²АО «НПО «Микроген», 127473, Москва, Россия;

³ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

Целью данной работы было изучение генетической стабильности производственного штамма Ленинград-16 (Л-16) вируса кори, используемого для производства вакцины АО «НПО «Микроген».

Материалы и методы. В исследовании использованы серии производственного и посевного штаммов Л-16 (АО «НПО «Микроген»), готовые серии вакцин кори различных производителей, штамм генотипа D6 вируса кори. Молекулярно-генетическое исследование штаммов проведено с применением полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией, последующей рестрикцией и секвенированием.

Результаты. Получены полногеномные последовательности производственного и посевного штаммов Л-16 для производства вакцины. Последовательность вакцинного штамма представлена в GenBank. Штамм Л-16 генетически стабилен. Полученные данные позволили продемонстрировать возможность использования метода ОТ-ПЦР с последующей рестрикцией для подтверждения подлинности вакцинного штамма Л-16 в готовых моно- и трехкомпонентных формах вакцин.

Заключение. Результаты проведенного исследования позволяют предположить возможность применения молекулярно-генетических методов для подтверждения подлинности изученных штаммов не только на этапах производства, но и в готовых сериях вакцин.

Ключевые слова: вирус кори штамм Ленинград-16; генетическая стабильность; метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов.

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

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

Для цитирования: Игнатъев Г.М., Отрашевская Е.В., Суханова Л.Л., Сидоренко Е.С., Нетесова Н.А. Молекулярно-генетическое исследование штамма Ленинград-16, используемого для производства вакцины кори. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(2): 182–189.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-182-189>

Поступила 03.03.2020
Принята в печать 29.03.2020

Molecular genetic analysis of the strain Leningrad-16 used for the production of measles vaccine

Georgy M. Ignatyev^{1✉}, Alena V. Atrasheuskaya², Lidiya L. Sukhanova²,
Elena S. Sidorenko², Nina A. Netesova³

¹Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, 108819, Moscow, Russia;

²Scientific and Production Association for Immunological Preparations «Microgen», 127473, Moscow, Russia;

³State Scientific Center of Virology and Biotechnology «Vector», 630559, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

Aim. To study the genetic stability of the measles virus strain Leningrad-16 (L-16) used for the production of vaccine at JSC NPO Mikrogen.

Materials and methods. A series of production and sowing strains of L-16 (JSC NPO Mikrogen), ready-made series of measles vaccines from various manufacturers, and the strain of measles virus genotype D6 were studied. Molecular genetic study of the strains was performed using RT-PCR followed by restriction analysis and sequencing.

Results. The complete genome sequences of the production and sowing strains of L-16 that are used for vaccine production were obtained. The sequence of the vaccine strain was deposited in GenBank. Strain L-16 was confirmed to be genetically stable. The obtained data demonstrated the possibility of using the RT-PCR method with subsequent restriction analysis to confirm the authenticity of the vaccine strain L-16 in finished mono and three component vaccines.

Conclusion. The results of the study suggest the applicability of the molecular genetic methods to confirm the authenticity of the studied strains not only at the production stages, but also in the finished series of vaccines.

Keywords: measles virus strain Leningrad-16; genetic stability; restriction fragment length polymorphism method.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

For citation: Ignatyev G.M., Atrasheuskaya A.V., Sukhanova L.L., Sidorenko E.S., Netesova N.A. Molecular genetic analysis of the strain Leningrad-16 used for the production of measles vaccine. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(2): 182–189. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-182-189>

Received 3 March 2020

Accepted 29 March 2020

Корь является высококонтагиозным заболеванием, характеризующимся в продромальном периоде лихорадкой, кашлем, насморком, конъюнктивитом, с последующим появлением генерализованной макулопапулезной сыпи [1, 2]. Вирус кори, вызывающий данное заболевание, относится к роду *Morbillivirus*, семейству *Paramyxoviridae* [1, 2]. На основании данных о нуклеотидной последовательности различают 24 генотипа вируса кори. Генотипирование проводят по нуклеотидной последовательности не менее 450 п.н., кодирующей СООН-концевой фрагмент белка нуклеопротеина N [1, 2]. Средством профилактики заболевания является использование живой вакцины кори, для производства которой применяют аттенуированные штаммы. Штаммы Moraten, АИК-С, Schwarz, Edmonston-Zagreb и Edmonston В получены из исходного штамма Edmonston, штаммы SAM-70, Shanghai-191, Changchun-47 и Ленинград-16 (Л-16) получены независимо [3–6]. При этом штаммы Changchun-47 и Л-16 пассировались на разных культурах клеток, но имеют общего «прародителя» — штамм Ленинград-4. Все указанные вакцинные штаммы относятся к генотипу А [2–6].

В России вакцина коревая культуральная живая производится АО «НПО «Микроген» и ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Оба производителя используют один штамм — Л-16. Современные требования к производству вакцинных препаратов, содержащих живые штаммы вирусов, предполагают контроль генетической стабильности производственных штаммов, в том числе штаммов вируса кори (ШВК), что рекомендовано International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (Меж-

дународная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных препаратов для человека)¹ и Государственной фармакопеей РФ². Все производители, кроме Serum Institute of India (Индия), сделали доступной информацию о нуклеотидной структуре производственных ШВК и об их генетической стабильности [3–6]. Информация о нуклеотидной структуре штаммов для контроля подлинности вакцинных штаммов, причем не только на этапах производства, но и в готовых сериях вакцины, позволяет применить молекулярно-генетические методы.

Государственная фармакопея РФ для подтверждения подлинности производственного ШВК, как и производственных штаммов паротита и краснухи, регламентирует использование реакции нейтрализации². Для вирусов кори, паротита и краснухи известен высокий серологический перекрест между штаммами — иммунная сыворотка, полученная к вакцинному штамму, обладает вируснейтрализующей активностью по отношению к другим штаммам семейства [7–11]. Таким образом, метод нейтрализации вакцинного штамма специфической иммунной сывороткой позволяет только подтвердить принадлежность исследуемого вакцинного штамма вируса к роду и семейству. Напротив, метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) (restriction fragment length polymorphism —

¹ ICH Guidance, Q5D: Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products (63 FR 50244; September 21, 1998).

² ФС.3.3.1.0032.15. Вакцина коревая культуральная живая. URL: <https://pharmacopoeia.ru/fs-3-3-1-0032-15-vaktsina-korevaya-kulturalnaya-zhivaya/>

RFLP) позволяет подтвердить подлинность именно-го вакцинного штамма, что было продемонстрировано для вируса паротита Ленинград-3, вируса краснухи штамма RA-27/3 и ШВК Shanghai-191 [11–13].

Целью настоящей работы было исследование структуры производственного и посевного ШВК Л-16, используемого АО «НПО «Микроген» для производства моновалентной и трехкомпонентной вакцин, а также изучение возможности применения молекулярно-генетических методов для подтверждения подлинности производственного штамма в готовой форме вакцины.

Материалы и методы

В работе использован вирус кори генотипа D6 (MV226, Mvi/Luxembourg LUX/30/97/2), любезно предоставленный доктором С.Р. Muller [8]. Штамм применялся в качестве контроля при проведении рестрикционного анализа вакцинных ШВК.

В работе использованы вакцины следующих производителей:

1) АО «НПО «Микроген»:

- производственный ШВК Л-16 (серия № 10);
- посевной ШВК Л-16 (серия № 200);
- комбинированная вакцина против кори, краснухи и паротита «Вактривир» (серии M0015эк, M0020эк, M0021эк);
- вакцина против краснухи культуральная живая аттенуированная (одна серия);
- вакцина паротитная (штамм Ленинград-3, одна серия);
- вакцина коревая живая аттенуированная (штамм Л-16, три серии);

2) «Serum Institute of India» — вакцина против кори, паротита и краснухи живая аттенуированная (четыре серии);

3) «GlaxoSmithKline Biologicals» — «Приорикс», вакцина против кори, паротита и краснухи живая аттенуированная (три серии);

4) «Merck & Co., Inc.» — «ProQuad», вакцина против кори, паротита, краснухи и ветряной оспы (одна серия).

Для выделения РНК из образцов применяли набор «РИБО-сорб» («АмплиСенс», Россия), выделенная РНК находилась в объеме 50 мкл.

При проведении реакции обратной транскрипции (ОТ) и гидролиза эндонуклеазой рестрикции использовали ферменты и компоненты реакционных смесей производства НПО «СибЭнзим» (Россия).

Плазмида pUCL16 (НПО «СибЭнзим», кат. № D19) служила в качестве положительного контроля при проведении ОТ-ПЦР и ПДРФ. ДНК плазмиды pUCL16 составляет 3568 п.н. Плазмида содержит уникальные сайты узнавания для EcoR1, SacI, KpnI, XmaI, BamHI, XbaI, SalI, HincII, AccI, PstI, BspMI, SphI и HindIII, локализованные в полилинкере. Плазмида содержит вставку фрагмента

кДНК вируса кори, штамм Л-16, длиной 882 п.н., соответствующие позициям 1466–2324 п.н. в геноме вируса кори. Фрагмент имеет сайты рестрикции рестриктазами BstSFI и CciI.

Реакция ОТ проводилась в условиях, подробно описанных ранее [12]. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) осуществлялась в тех же пробирках, что и ОТ, поскольку все необходимые для ПЦР компоненты уже содержались в растворах, а матрицей служила кДНК, наработанная с вирусной РНК. Режим термоциклирования полностью соответствовал описанному ранее [12].

После прохождения ПЦР к 25 мкл полученной смеси добавляли 5 мкл буфера для рестрикции «ROSE» (кат. № B021) и 20 мкл воды, затем делили на 2 аликвоты по 25 мкл и к одной из них добавляли 1 мкл рестриктазы CciI. После инкубации в течение 1 ч при 37°C пробы наносили на 1,5% агарозный гель и проводили электрофорез в ТАЕ-буфере.

Для определения полных последовательностей производственного штамма и посевного ШВК Л-16 (АО «НПО «Микроген») были синтезированы праймеры, полностью перекрывающие последовательность генома вируса кори с шагом 500 п.н. [14].

Секвенирование проводили на приборе «Prism 310 Genetic Analyzer» с использованием набора «BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit» («Applied Biosystems»). Данные секвенирования анализировали с помощью программы «Chromas 2.22» («Technelysium Pty Ltd.»).

Результаты

Изучение первичной структуры полноразмерных геномов производственного и посевного ШВК Л-16

Производственный ШВК Л-16 (серия № 10, приготовленная в 1993 г.) прошел 21 пассаж в первичной культуре клеток почек морских свинок и 4 пассажа в первичной культуре клеток фибробластов японских перепелов. Посевной ШВК Л-16 (серия № 200, приготовленная в 2003 г.) прошел 21 пассаж в первичной культуре клеток почек морских свинок и 6 пассажей в первичной культуре клеток фибробластов японских перепелов. В процессе производства готовой серии вакцины посевной вирус проходит 1 пассаж в культуре клеток фибробластов японских перепелов.

Результаты секвенирования кДНК производственного штамма представлены в GenBank (№ JF727649). Сравнительные результаты секвенирования кДНК посевного вируса и кДНК, полученной из готовой серии вакцины (GenBank JF727650), приготовленной из указанного посевного вируса, свидетельствуют о том, что нуклеотидные послед-

довательности идентичны последовательностям производственного штамма. Это говорит о том, что штамм Л-16 АО «НПО «Микроген» генетически стабилен на этапах производства вакцины.

Выбор фрагмента ШВК Л-16, пригодного для подтверждения подлинности штамма методом ПДРФ

Для ШВК Л-16 выбор фрагментов для дальнейшего использования ПДРФ осуществлялся в соответствии с критериями, описанными ранее [12].

Для анализа из базы данных GenBank выбраны референсные последовательности всех 24 геномов вируса кори и всех вакцинных штаммов. В качестве первого шага анализа проведено сравнение референсных последовательностей по СООН-концевому фрагменту белка нуклеопротеина N позиции 1126–1575 н.о., т.е. области, используемой для генотипирования. Анализ множественного выравнивания показывает, что референсная последовательность генотипа А вируса кори отличается от референсных последовательностей других генотипов в позиции 1547 (нуклеотидный остаток Т, в то время как в других последовательностях — G). Нуклеотидный остаток Т входит в состав сайта узнавания рестриктазы BstSFI (СТАТАG), что делает возможным использование метода ПДРФ для дифференциации генотипа А от других генотипов за один шаг. Из 48 полногеномных последовательностей генотипа А вируса кори, представленных в GenBank, 43 содержат сайт узнавания рестриктазы BstSFI в виде последовательности СТАТАG. Среди вакцинных штаммов только штамм Shanghai-191 не содержит этого сайта.

Проведенный BLAST-анализ не выявил присутствия сайта этой рестриктазы в данном участке генома в штаммах, относящихся к другим генотипам. Таким образом, метод ПДРФ с использованием рестриктазы BstSFI (SfeI) может позволить с высокой степенью точности (~90%) определить принадлежность штамма к генотипу А.

Для анализа нуклеотидных последовательностей выбраны полные последовательности геномов вакцинных штаммов вируса кори из базы данных GenBank: AIK-C (AF266286, AB046218), Moraten (AF266287), Morten (FJ211583), Schwartz (FJ211589), Edmonston-Zagreb (AY486083), CAM-70 (DQ345722, DQ345721), Changchun-47 (FJ416068), Shanghai (FJ416067), Л-16 (JF727650, JF727649). Множественное выравнивание последовательностей вакцинных штаммов и референсного штамма генотипа А Edmonston с целью выявления нуклеотидных замен, присущих только ШВК Л-16, показало, что этот штамм имеет уникальные замены (**таблица**).

Две из 4 уникальных замен формируют сайты эндонуклеаз рестрикции (подчеркнуты в таблице), которые можно использовать для дифференциации ШВК Л-16 с помощью метода ПДРФ. Это сайты TCATGA (CciI) и CATG (FatI и FaeI) возле позиции 2143, а также сайт AGCT (AluI и AluVI) возле позиции 7190. Для проведения гидролиза кДНК представляется удобным применять более крупнощеплящую рестриктазу CciI.

BLAST-анализ фрагмента, который содержит сайт TCATGA у ШВК Л-16, показал, что этот сайт не содержится ни в одном из опубликованных геномов других ШВК — как принадлежащих к генотипу А (включая все вакцинные штаммы), так и в других генотипах. Таким образом, этот сайт может служить уникальным маркером данного вакцинного штамма.

Выбор праймеров для амплификации участка генома с сайтом TCATGA в позиции 2143, расчет длин фрагментов, образующихся при гидролизе ПЦР-продукта

Для амплификации фрагмента, содержащего сайт TCATGA, были подобраны праймеры, позволяющие амплифицировать фрагмент длиной 378 п.н.: L1970f 5' CAG GCA GTT CGG GTC TCA GCA

Сравнение отличий геномов штамма Л-16 и других вакцинных штаммов

Comparison of differences in the genomes of Leningrad-16 strain and other vaccine strains

Позиция Position	Нуклеотид в геноме штамма Л-16 (контекстная последовательность) Nucleotide in the genome of Leningrad-16 strain (context sequence)	Нуклеотид в других вакцинных штаммах (контекстная последовательность) Nucleotide in other vaccine strains (context sequence)
2143	С TTATTATGTT TCATG ATCACAG	Т TYRRTAYGTTT TATG ATCACAG
3586	С GATGAATGCT CTATG TACATG	Т GATGAATGCTT TATG TACATG
7190	Т AGCATCAAG CTC ACCTGAAAT	С AGCATCAAG CCCC ACCTGAAAT
9117	А GGAACCAAT CACAG ATAGGGC	Г GGAACCAAT CGCAG ATAGGGC

3'; L2324r 5' CAG AAG CCC TGA ACC CCA TAG AGA 3'. В результате ПЦР с применением этих праймеров будет амплифицироваться фрагмент ДНК длиной 378 п.н., содержащий сайт рестриктазы CsiI, имеющийся только у штамма Л-16. После обработки рестриктазой CsiI этот фрагмент (в случае использования в реакции кДНК штамма Л-16) распадется на 2 фрагмента с длинами 175 и 203 п.н. В качестве положительного контроля при проведении реакции возможно использование плазмиды ДНК pUCL16 (НПО «СибЭнзим»).

При применении вышеописанных праймеров будет получен фрагмент длиной 378 п.н. При гидролизе фрагмента рестриктазой CsiI будут получены фрагменты длиной 175 и 203 п.н. При использовании праймеров для амплификации фрагмента для генотипирования [2, 14] будет получен фрагмент длиной 481 п.н. с сайтом рестрикции рестриктазой BstSFI. При гидролизе фрагмента рестриктазой BstSFI будут получены фрагменты длиной 188 и 293 п.н. (рис. 1).

Результаты ОТ-ПЦР с последующей рестрикцией рестриктазой CsiI в образцах, содержащих ШВК

Для выделения РНК и последующего проведения ОТ-ПЦР с рестрикцией использовали ШВК и образцы готовых форм вакцины различных производителей. Результат ОТ-ПЦР с последующей рестрикцией представлен на рис. 2. При амплификации посевного штамма и штамма из готовой

формы вакцины получен ампликон с предполагаемой расчетной длиной 378 п.н. При рестрикции полученного ампликона рестриктазой CsiI получены 2 фрагмента с расчетными длинами 175 и 203 п.н.

При проведении ОТ-ПЦР с последующей рестрикцией ШВК генотипа Д6, готовых форм вакцин различных производителей, содержащих разные ШВК, получен ампликон расчетной длины, однако результат его рестрикции рестриктазой CsiI отрицательный: фрагменты с расчетными длинами 175 и 203 п.н. не получены (рис. 2). Это связано с тем, что штаммы других генотипов вируса кори и ШВК, используемые другими производителями, не содержат сайт рестрикции CsiI во фрагменте генома с 1970 по 2324 н.о.

При проведении в тех же условиях ОТ-ПЦР с последующей рестрикцией вакцин против паротита и краснухи производства АО «НПО «Микроген» фрагмент длиной 378 п.н. амплифицирован не был, т.е. результат был отрицательным.

Таким образом, выбранные праймеры позволяют провести ОТ-ПЦР всех РНК, выделенных из образцов, содержащих вирус кори, и получить ампликон размером 378 п.н. (рис. 2). Только те фрагменты, которые содержат сайт рестрикции для рестриктазы CsiI, характерный для ШВК Л-16, при проведении рестрикции позволяют получить 2 фрагмента длинами 175 и 203 п.н.

Таким образом, предложенный для амплификации с последующей рестрикцией фрагмент ШВК Л-16 позволяет подтвердить подлинность штамма

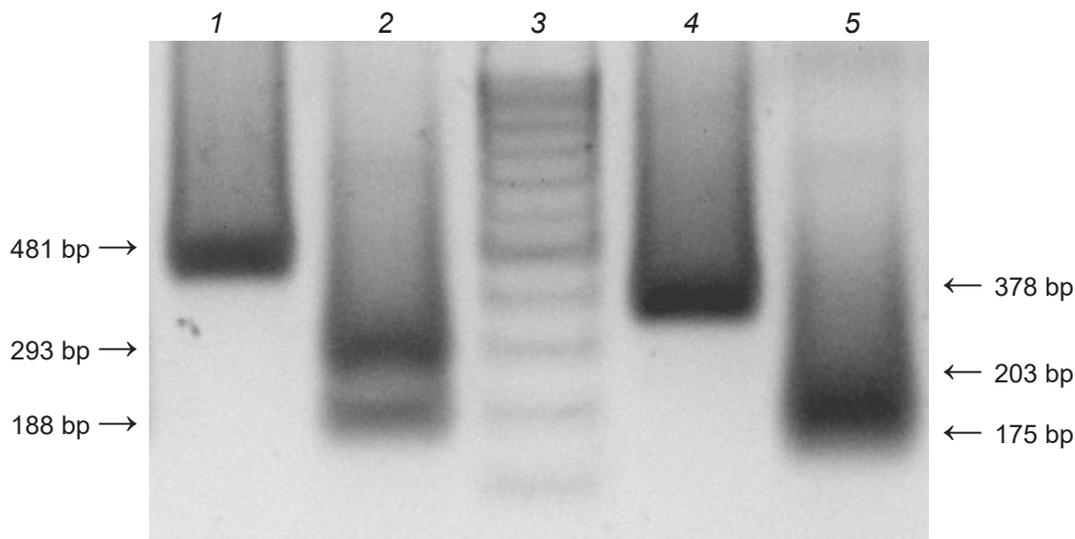


Рис. 1. Гидролиз ПЦР-продуктов, полученных после амплификации фрагментов ДНК плазмиды pUCL16.

1 — ампликон длиной 481 п.н., содержащий сайт рестрикции рестриктазой BstSFI; 2 — продукты гидролиза ампликона рестриктазой BstSFI (188 и 293 п.н.); 3 — маркер длин фрагментов «100 bp» (НПО «СибЭнзим»); 4 — ампликон длиной 378 п.н., содержащий сайт рестрикции рестриктазой CsiI; 5 — продукты гидролиза ампликона рестриктазой CsiI (175 и 203 п.н.).

Fig. 1. Cleavage of PCR products amplified from plasmid pUCL16.

1 — amplicon of 481 bp in length carrying a recognition site of restriction enzyme BstSFI; 2 — products of amplicon hydrolysis by BstSFI restriction enzyme (188 and 293 bp); 3 — DNA marker of fragment lengths «100 bp» (NPO SibEnzyme); 4 — amplicon of 378 bp in length carrying a recognition site of restriction enzyme CsiI; 5 — products of amplicon hydrolysis by restriction enzyme CsiI (175 and 203 bp).

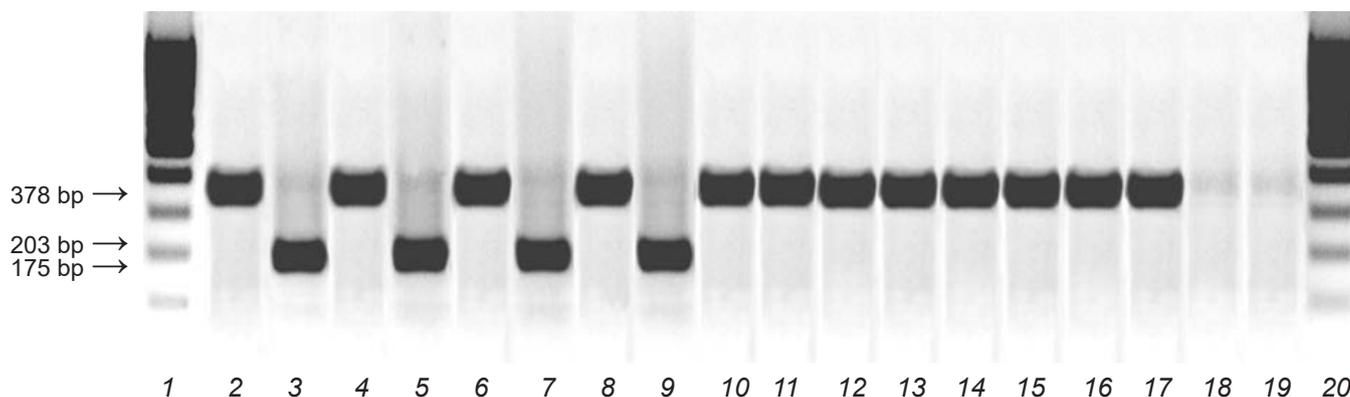


Рис. 2. Результаты ПДРФ-анализа продуктов ОТ-ПЦР образцов РНК, полученных из вакцин различных производителей, содержащих и не содержащих штамм Л-16 вируса кори.

Дорожки 1, 18: маркер длин фрагментов «100 bp» (НПО «СибЭнзим»); 2 — ампликон плазмиды pUCL16 (378 п.н.); 3 — ПДРФ-анализ ампликона плазмиды pUCL16 (175 и 203 п.н.); 4 — ампликон, полученный в результате ОТ-ПЦР препарата РНК, выделенного из посевного штамма Л-1; 5 — ПДРФ-анализ ампликона на дорожке 4; 6 — ампликон, полученный в результате ОТ-ПЦР препарата РНК, выделенного из готовой серии моновакцины кори (штамм Л-16, АО «НПО «Микроген»); 7 — ПДРФ-анализ ампликона на дорожке 6; 8 — ампликон, полученный в результате ОТ-ПЦР препарата РНК, выделенного из готовой серии вакцины «Вактивир» (АО «НПО «Микроген»); 9 — ПДРФ-анализ ампликона на дорожке 8; 10 — ампликон, полученный в результате ОТ-ПЦР препарата РНК, выделенного из готовой серии вакцины Serum Institute of India; 11 — ПДРФ-анализ ампликона на дорожке 10; 12 — ампликон, полученный в результате ОТ-ПЦР препарата РНК, выделенного из готовой серии вакцины GSK; 13 — ПДРФ-анализ ампликона на дорожке 12; 14 — ампликон, полученный в результате ОТ-ПЦР препарата РНК, выделенного из готовой серии вакцины «Merck»; 15 — ПДРФ-анализ ампликона на дорожке 14; 16 — ампликон, полученный в результате ОТ-ПЦР препарата РНК, выделенного из штамма вируса кори генотипа D4; 17 — ПДРФ-анализ ампликона на дорожке 16; 18 — ампликон, полученный в результате ОТ-ПЦР препарата РНК, выделенного из готовой серии вакцины паротита АО «НПО «Микроген»; 19 — ампликон, полученный в результате ОТ-ПЦР препарата РНК, выделенного из готовой серии вакцины краснухи АО «НПО «Микроген».

Fig. 2. RLFP analysis of RT-PCR of RNA samples isolated from various manufacturers' vaccines containing and not containing the Leningrad-16 strain of the measles virus.

Lines 1, 18: DNA ladder «100 bp» («SibEnzyme»); 2 — amplicon of plasmid pUCL16 (378 bp); 3 — RFLP analysis of the amplicon on line 2 (175 and 203 bp); 4 — amplicon produced by RT-PCR of RNA isolated from a sowing Leningrad-16 strain; 5 — RFLP analysis of the amplicon on line 4; 6 — amplicon produced by RT-PCR of RNA isolated from final series of measles monovaccine (Leningrad-16 strain, «Microgen»); 7 — RFLP analysis of the amplicon on line 6; 8 — amplicon produced by RT-PCR of RNA preparation isolated from the final series of the vaccine «Vactivir» («Microgen»); 9 — RFLP analysis of the amplicon on line 8; 10 — amplicon produced by RT-PCR of RNA isolated from final series of vaccines from Serum Institute of India; 11 — RFLP analysis of the amplicon on line 10; 12 — amplicon produced by RT-PCR of RNA isolated from final series of vaccines GSK; 13 — RFLP analysis of the amplicon on line 12; 14 — amplicon produced by RT-PCR of RNA isolated from final series vaccines «Merck»; 15 — RFLP analysis of the amplicon on line 14; 16 — amplicon produced by RT-PCR of RNA, isolated from a strain of measles virus genotype D4; 17 — RFLP analysis of the amplicon on line 16; 18 — amplicon produced by RT-PCR of RNA isolated from final series of vaccine mumps («Microgen»); 19 — amplicon produced by RT-PCR of RNA isolated from final series of vaccine rubella («Microgen»).

не только на этапах производства, но и в готовой форме вакцины.

Применение подобранных праймеров для амплификации фрагмента длиной 378 п.н. и эндонуклеазы рестрикции ScaI позволяет отличить ШВК Л-16 от ШВК, используемых при производстве других вакцин, с помощью ПДРФ.

Закключение

ШВК Л-16 для производства коревой вакцины генетически стабилен на всех этапах производства. Более специфичными для подтверждения подлинности вакцинных штаммов являются молекулярно-генетические методы контроля. Метод ПДРФ применим и для подтверждения подлинности ШВК Л-16 и может быть использован не только на стадиях производства вакцины, но и в готовой форме препарата — как в моно-, так и в комбинированных вакцинах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Moss W. Measles. *Lancet*. 2017; 390(10111): 2490-502. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31463-0](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31463-0)
2. Measles virus nomenclature update: 2012. *Wkly Epidemiol. Rec*. 2012; 87(9): 73-81.
3. Bankamp B., Takeda M., Zhang Y., Xu W., Rota P.A. Genetic characterization of measles vaccine strains. *J. Infect. Dis*. 2011; 204(Suppl. 1): S533-48. DOI: <http://doi.org/10.1093/infdis/jir097>
4. Borges M.B., Caride E., Jabor A.V., Malachias J.M., Freire M.S., Homma A., et al. Study of the genetic stability of measles virus CAM-70 vaccine strain after serial passages in chicken embryo fibroblast primary cultures. *Virus Genes*. 2008; 36(1): 35-44. DOI: <http://doi.org/10.1007/s11262-007-0173-1>
5. Tillieux S.L., Halsey W.S., Sathe G.M., Vassilev V. Comparative analysis of the complete nucleotide sequences of measles, mumps, and rubella strain genomes contained in Priorix-Tetra and ProQuad live attenuated combined vaccines. *Vaccine*. 2009; 27(16): 2265-73. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.112>
6. Zhang Y., Zhou J., Bellini W., Xu W., Rota P.A. Genetic characterization of Chinese measles vaccines by analysis of complete

- genomic sequences. *J. Med. Virol.* 2009; 81(8): 1477-83.
DOI: <http://doi.org/10.1002/jmv.21535>
7. Отрашевская Е.В., Букин Е.К., Красильников И.В., Игнатьев Г.М. Специфический гуморальный иммунитет после однократной иммунизации паротитной вакциной: результаты трехлетнего наблюдения. *Вопросы вирусологии.* 2011; 56(3): 45-8.
 8. Atrasheuskaya A.V., Kulak M.V., Neverov A.A., Rubin S., Ignatyev G.M. Measles cases in highly vaccinated population of Novosibirsk, Russia, 2000–2005. *Vaccine.* 2008; 26(17): 2111-8.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.02.028>
 9. Kanbayashi D., Kurata T., Takahashi K., Kase T., Komano J. A novel cell-based high throughput assay to determine neutralizing antibody titers against circulating strains of rubella virus. *J. Virol. Methods.* 2018; 252: 86-93.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.11.011>
 10. McLean H.Q., Fiebelkorn A.P., Ogee-Nwankwo A., Hao L., Coleman L.A., Adebayo A., et al. Rubella virus neutralizing antibody response after a third dose of measles-mumps-rubella vaccine in young adults. *Vaccine.* 2018; 36(38): 5732-7.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.08.010>
 11. Xu C.P., Li M.H., He H.Q., Lu Y.Y., Feng Y. Laboratory diagnosis of vaccine-associated measles in Zhejiang Province, China. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2017; 50(5): 578–85.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jmii.2015.10.004>
 12. Игнатьев Г.М., Отрашевская Е.В., Суханова Л.Л., Сидоренко Е.С., Нетесова Н.А. Молекулярно-генетическое исследование штамма RA-27/3, используемого для производства вакцины против краснухи. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2019; (4): 38–46.
DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-4-38-46>
 13. Кулак М.В., Белавин П.А., Нетесова Н.А., Юнасова Т.Н., Голикова Л.Н., Бёктемуров Т.А. и др. Дифференциация вакцинного штамма Л-3 от других штаммов вируса паротита методом ОТ-ПЦР. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2008; (4): 7-10.
 14. Neverov A.A., Riddell M.A., Moss W.J., Volokhov D.V., Rota P.A., Lowe L.E. Genotyping of measles virus in clinical specimens on the basis of oligonucleotide microarray hybridization patterns. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(10): 3752-9.
DOI: <http://doi.org/10.1128/JCM.00998-06>
 15. CAM-70 vaccine strain after serial passages in chicken embryo fibroblast primary cultures. *Virus Genes.* 2008; 36(1): 35-44.
DOI: <http://doi.org/10.1007/s11262-007-0173-1>
 16. Tillieux S.L., Halsey W.S., Sathe G.M., Vassilev V. Comparative analysis of the complete nucleotide sequences of measles, mumps, and rubella strain genomes contained in Priorix-Tetra and ProQuad live attenuated combined vaccines. *Vaccine.* 2009; 27(16): 2265-73.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.112>
 17. Zhang Y., Zhou J., Bellini W., Xu W., Rota P.A. Genetic characterization of Chinese measles vaccines by analysis of complete genomic sequences. *J. Med. Virol.* 2009; 81(8): 1477-83.
DOI: <http://doi.org/10.1002/jmv.21535>
 18. Otrasheskaya E.V., Bukin E.K., Krasil'nikov I.V., Ignatyev G.M. Specific humoral immunity after single immunization with mumps vaccine: data of a 3-year follow-up. *Voprosy virusologii.* 2011; 56(3): 45-8. (in Russian)
 19. Atrasheuskaya A.V., Kulak M.V., Neverov A.A., Rubin S., Ignatyev G.M. Measles cases in highly vaccinated population of Novosibirsk, Russia, 2000–2005. *Vaccine.* 2008; 26(17): 2111-8.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.02.028>
 20. Kanbayashi D., Kurata T., Takahashi K., Kase T., Komano J. A novel cell-based high throughput assay to determine neutralizing antibody titers against circulating strains of rubella virus. *J. Virol. Methods.* 2018; 252: 86-93.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.11.011>
 21. McLean H.Q., Fiebelkorn A.P., Ogee-Nwankwo A., Hao L., Coleman L.A., Adebayo A., et al. Rubella virus neutralizing antibody response after a third dose of measles-mumps-rubella vaccine in young adults. *Vaccine.* 2018; 36(38): 5732-7.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.08.010>
 22. Xu C.P., Li M.H., He H.Q., Lu Y.Y., Feng Y. Laboratory diagnosis of vaccine-associated measles in Zhejiang Province, China. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2017; 50(5): 578-85.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jmii.2015.10.004>
 23. Ignatyev G.M., Otrasheskaya E.V., Sukhanova L.L., Sidorenko E.S., Netesova N.A. Molecular-genetic study of the RA-27/3 strain used for production of rubella vaccine. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii.* 2019; (4): 38–46.
DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-4-38-46> (in Russian)
 24. Kulak M.V., Belavin P.A., Netesova N.A., Yunasova T.N., Golikova L.N., Bektemirov T.A., et al. Differentiation of the vaccine strain L-3 from other strains of the mumps virus by RT-PCR. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie.* 2008; (4): 7-10. (in Russian)
 25. Neverov A.A., Riddell M.A., Moss W.J., Volokhov D.V., Rota P.A., Lowe L.E. Genotyping of measles virus in clinical specimens on the basis of oligonucleotide microarray hybridization patterns. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(10): 3752-9.
DOI: <http://doi.org/10.1128/JCM.00998-06>

REFERENCES

1. Moss W. Measles. *Lancet.* 2017; 390(10111): 2490-502.
DOI: [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31463-0](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31463-0)
2. Measles virus nomenclature update: 2012. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2012; 87(9): 73-81.
3. Bankamp B., Takeda M., Zhang Y., Xu W., Rota P.A. Genetic characterization of measles vaccine strains. *J. Infect. Dis.* 2011; 204(Suppl. 1): S533-48.
DOI: <http://doi.org/10.1093/infdis/jir097>
4. Borges M.B., Caride E., Jabor A.V., Malachias J.M., Freire M.S., Homma A., et al. Study of the genetic stability of measles virus

Информация об авторах:

Игнатьев Георгий Михайлович[✉] — д.м.н., проф., зам. руководителя производственного направления ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», 108819, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>.
E-mail: marburgman@mail.ru

Отрашевская Елена Викторовна — начальник отдела вакцин, бактериофагов и пробиотиков АО «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген», 127473, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2491-4072>.
E-mail: e.v.otrashevskaya@microgen.ru

Information about the authors:

Georgy M. Ignatyev[✉] — D. Sci. (Med.), Prof., Deputy Head, Production department, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, 108819, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>.
E-mail: marburgman@mail.ru

Alena V. Atrasheuskaya — Head, Department of vaccines, bacteriophages and probiotics, Scientific and Production Association for Immunological Preparations «Microgen», 127473, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2491-4072>.
E-mail: e.v.otrashevskaya@microgen.ru

Суханова Лидия Львовна — к.м.н., зам. директора по качеству, Московское предприятие бактериальных препаратов, АО «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген», 127473, Москва, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3987-2482>.

E-mail: sukhanova@microgen.ru

Сидоренко Елена Серафимовна — директор Московского подразделения по производству бактериальных препаратов, АО «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген», 127473, Москва, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8145-4554>.

E-mail: sidorenko@microgen.ru

Нетесова Нина Александровна — д.б.н., в.н.с. отдела геномных исследований ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9896-5403>.

E-mail: ninanet@vector.nsc.ru

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Lidiya L. Sukhanova — PhD (Med.), Deputy director for quality, Moscow Enterprise of Bacterial Preparations, Scientific and Production Association for Immunological Preparations «Microgen», 127473, Moscow, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3987-2482>.

E-mail: sukhanova@microgen.ru

Elena S. Sidorenko — Director, Moscow Enterprise of Bacterial Preparations, Scientific and Production Association for Immunological Preparations «Microgen», 127473, Moscow, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8145-4554>.

E-mail: sidorenko@microgen.ru

Nina A. Netesova — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Department of genomic research, State Scientific Center of Virology and Biotechnology «Vector», 630559, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9896-5403>.

E-mail: ninanet@vector.nsc.ru

Contribution: the authors contributed equally to this article.