

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

ЖУРНАЛ МИКРОБИОЛОГИИ, ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ИММУНОБИОЛОГИИ

(Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii)

Двухмесячный научно-практический журнал

Основан в 1924 г.

Рецензируемый «Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии» рассматривает актуальные проблемы мировой науки и обеспечивает синтез новейших результатов исследований в области микробиологии, вирусологии, эпидемиологии, вакцинологии, иммунобиологии, профилактики и лечения инфекционных заболеваний. Междисциплинарный подход дает возможность интеграции передовых научных знаний смежных специальностей, широкого видения проблем фундаментальной и прикладной инфектологии, а также комплексного подхода к созданию биомедицинских технологий. К публикации принимаются научные труды российских и зарубежных исследователей, лекции, а также методические материалы и законодательные документы в области сохранения эпидемиологического благополучия населения.

Журнал входит в 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)

4

ИЮЛЬ – АВГУСТ

**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
русскоязычные статьи 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;
DOAJ; ROAD; 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

111123, 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 25.08.2020.

Формат 60×90^{1/8}.

Тираж 280 экз. Усл.-печ. л. 6,5.

Отпечатано в типографии

«Буки Веди». www.bukivedi.com.

E-mail: info@bukivedi.com.

© ФБУН ЦНИИ эпидемиологии
Роспотребнадзора, 2020

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Зверев В.В., д.б.н., проф., академик РАН, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Заместитель главного редактора

Семенов Т.А., д.м.н., проф., руководитель отдела эпидемиологии ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

Ответственный секретарь

Платонов А.Е., д.м.н., проф., зав. лабораторией эпидемиологии природно-очаговых инфекций, ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Акимкин В.Г., д.м.н., проф., академик РАН, директор ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Брико Н.И., д.м.н., проф., академик РАН, директор Института общественного здоровья, зав. кафедрой эпидемиологии и доказательной медицины, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Брусина Е.Б., д.м.н., проф., зав. кафедрой эпидемиологии, Кемеровский государственный медицинский университет, Кемерово, Россия

Бухарин О.В., д.м.н., проф., академик РАН, главный научный сотрудник, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН, Оренбург, Россия

Гинцбург А.Л., д.б.н., проф., академик РАН, директор ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

Жирнов О.П., д.б.н., проф., чл.-корр. РАН, зав. лабораторией вирусного патогенеза Института вирусологии им. Д.И. Иванковского, ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

Караулов А.В., д.м.н., проф., академик РАН, зав. кафедрой клинической иммунологии и аллергологии Института клинической медицины, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

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

Лобзин Ю.В., д.м.н., проф., академик РАН, директор, Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

Лукашев А.Н., д.м.н., проф., член-корр. РАН, директор Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Максютов Р.А., д.б.н., генеральный директор, ГНЦ вирусологии и биотехнологии (Вектор) Роспотребнадзора, Новосибирск, Россия

Малеев В.В., д.м.н., проф., академик РАН, советник директора, ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Михайлов М.И., д.м.н., проф., чл.-корр. РАН, зав. лабораторией вирусных гепатитов НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва; проф. кафедры эпидемиологии Белгородского государственного университета, Белгород, Россия

Онищенко Г.Г., д.м.н., проф., академик РАН, зав. кафедрой экологии человека и гигиены окружающей среды, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Покровский В.И., д.м.н., проф., академик РАН, советник директора ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Свитич О.А., д.м.н., чл.-корр. РАН, директор, НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

Сергиев В.П., д.м.н., проф., академик РАН, почетный директор Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Тартаковский И.С., д.б.н., проф., зав. лабораторией легионеллеза, ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

Тотолян А.А., д.м.н., проф., академик РАН, директор, Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Урываев Л.В., д.м.н., проф., чл.-корр. РАН, заместитель директора Института вирусологии им. Д.И. Иванковского, ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

Филатов Н.Н., д.м.н., проф., чл.-корр. РАН, заместитель директора, НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

Черкасов С.В., д.м.н., проф., чл.-корр. РАН, врио директора, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН, Оренбург, Россия

Шаркова В.А., д.м.н., проф., зав. кафедрой микробиологии и вирусологии, 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 K. Mamadov, 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 dedicated to the most significant issues of world science and provides a synthesis of the cutting edge research in the field of microbiology, virology, epidemiology, vaccinology, immunobiology, prevention of infectious diseases.

The journal accepts for publication Russian and foreign research papers, lectures, methodological materials, legislative documents in the field of preserving the epidemiological well-being 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 infectology and a comprehensive approach to creating innovative biomedical 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)

4

JULY – AUGUST

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 Russian-language 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; DOAJ; ROAD; 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, 111123, 3A, Novogireevskaya St., Moscow, Russian Federation.
Phone/fax: +7(495) 974-96-46.
E-mail: crie@pcr.ru

EDITORIAL OFFICE:

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

Head of the Editorial and publishing department:

Olga V. Osokina

Head of Editorial Office:
Olga V. Ustinkova.

The Editorial Board is not responsible for the advertising content.

The materials that do not meet the requirements of the journal (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 August 25, 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

EDITOR-IN-CHIEF

Vitaly V. Zverev, Dr. Sci. (Biology), RAS Full Member, Professor, Head, Department of microbiology, virology and immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Deputy Editor

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

Executive Secretary

Alexander E. Platonov, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Head, Laboratory of Zoonoses, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia

EDITORIAL BOARD

Vasily G. Akimkin, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia

Nikolay I. Briko, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director, Institute of Public Health, Head, Department of Epidemiology and Evidence-Based Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Elena B. Brusina, professor, Dr. Sci. (Medicine), Head, Department of epidemiology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russia

Oleg V. Bukharin, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Principal Research Scientist, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis Ural Branch of RAS, Orenburg, Russia

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

Oleg P. Zhirnov, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Biology), Head, Laboratory of viral pathogenesis, N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology Moscow, Russia

Alexander V. Karaulov, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Head, Department of Clinical Immunology and Allergology, Institute of Clinical Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

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

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

Alexander N. Lukashev, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director, 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, Dr. Sci. (Biology), Director General, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Novosibirsk, Russia

Victor V. Maleev, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director adviser, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia

Mikhail I. Mikhaylov, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Head, Laboratory of viral hepatitis, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Professor, Department of epidemiology, Belgorod State University, Medical Institute, Belgorod, Russia

Gennadiy G. Onishchenko, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Head, Department of Human Ecology and Environmental Health, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Valentin I. Pokrovskiy, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Advisor to Director of Innovation, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia

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

Vladimir P. Sergiev, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director Emeritus, Martsinovskiy Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector-Borne Diseases, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Valentina A. Sharkova, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Head, Department of Microbiology and Virology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia

Igor S. Tartakovsky, Professor, Dr. Sci. (Biology), Head, Laboratory of legionellosis, N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

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

Leonid V. Uryvaev, Dr. Sci. (Medicine), Professor, RAS Corr. Member, Deputy Director, D.I. Ivanovskiy Virology Institute, N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Nikolay N. Filatov, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Deputy Director for Science, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Sergey V. Cherkasov, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch of RAS, 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 and 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 K. Mamadov, MD, DSc, Professor, National Oncology Center of the Ministry of Health of the Republic of Azerbaijan, Baku, Republic of Azerbaijan

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Асатрян М.Н., Герасимук Э.Р., Логунов Д.Ю., Семенов Т.А., Гинцбург А.Л.

Прогнозирование динамики заболеваемости COVID-19 и планирование мероприятий по вакцинопрофилактике населения Москвы на основе математического моделирования** 289

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

Характеристика маркеров холодовой адаптации кандидатных вакцинных штаммов для живых аттенуированных вакцин против ветряной оспы и опоясывающего герпеса* 303

Медкова А.Ю., Синяшина Л.Н., Амичба А.А., Семин Е.Г., Шевцова З.В., Матуа А.З., Джидарян А.А., Кубрава Д.Т., Конджария И.Г., Баркая В.С., Миквабия З.Я.³, Каратаев Г.И.

Доклинические исследования безопасности, иммуногенности и защитной активности аттенуированных бактерий *Bordetella pertussis* на экспериментальной модели *Musca mulatta** 312

Бутакова Л.В., Сапега Е.Ю., Троценко О.Е.

Молекулярно-эпидемиологические особенности циркуляции энтеровируса Коксаки А10 в Дальневосточном федеральном округе 324

Котенева Е.А., Цыганкова О.И., Калинин А.В., Родионов И.С., Абрамович А.В., Щербакова В.Ю.

Особенности получения белкового комплекса вегетативных культур *Bacillus anthracis* для протеомного картирования штаммов 331

ОБЗОРЫ

Шатунова П.О., Быков А.С., Свитич О.А., Зверев В.В.

Ангиотензинпревращающий фермент 2. Подходы к патогенетической терапии COVID-19** 339

Михайлова Н.А., Воеводин Д.А., Лазарев С.А.

Современные представления о про-/эукариотических взаимодействиях организма человека — основа создания нового поколения пробиотических препаратов* 346

Писанов Р.В., Шипко Е.С., Дуванова О.В., Симакова Д.И.

Идентификация микроорганизмов с применением газовой хромато-масс-спектрометрии 356

НАУКА И ПРАКТИКА

Фельдблюм И.В., Субботина К.А., Рычкова О.А., Миронов А.Н., Волкова Д.А., Метов А.О., Сакаева И.В., Купина Н.В., Карбышев М.С., Миронов Н.А., Кондратьева Я.Ю.

Реактогенность, безопасность и иммунологическая эффективность вакцины для профилактики ротавирусной инфекции пентавалентной живой при иммунизации детей (результаты многоцентрового клинического исследования)* 363

Кукаркина В.А., Голубкова А.А., Подымова А.С.

Современные практики иммунизации детей, экспонированных ВИЧ и ВИЧ-инфицированных 375

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

** Статья опубликована на русском и английском языках в печатном издании и на сайте журнала.

CONTENTS

ORIGINAL RESEARCHES

Asatryan M.N., Gerasimuk E.R., Logunov D.Yu., Semenenko T.A., Gintsburg A.L.

Predicting the dynamics of Covid-19 incidence and planning preventive vaccination measures for Moscow population based on mathematical modeling** 289

Nagieva F.G., Barkova E.P., Stroeveva A.D., Sidorov A.V., Zverev V.V.

Characterization of markers of cold-adapted candidate virus strains for live attenuated vaccines against chickenpox and shingles* 303

Medkova A.Yu., Sinyashina L.N., Amichba A.A., Semin E.G., Shevtsova Z.V., Matua A.Z., Djidaryan A.A., Kubrava D.T., Kondzhariya I.G., Barkaya V.S., Mikvabiya Z.Ya., Karataev G.I.

Preclinical studies of safety, immunogenicity and protective activity of attenuated *Bordetella pertussis* bacteria on the *Macaca mulatta* model* 312

Butakova L.V., Sapega E.Yu., Trotsenko O.E.

Molecular epidemiological features of the Coxsackievirus A10 circulation in the Far Eastern Federal District of Russia 324

Koteneva E.A., Tsygankova O.I., Kalinin A.V., Rodionov I.S., Abramovich A.V., Shcherbakova V.Yu.

Features of obtaining the protein complex of vegetative cultures *Bacillus anthracis* for proteomic mapping of strains 331

REVIEWS

Shatunova P.O., Bykov A.S., Svitich O.A., Zverev V.V.

Angiotensin-converting enzyme 2. Approaches to pathogenetic therapy of COVID-19** 339

Mikhailova N.A., Voevodin D.A., Lazarev S.A.

A modern view of pro-/eukaryote interactions in the human body as the basis for development of next-generation probiotics* 346

Pisanov R.V., Shipko E.S., Duvanova O.V., Simakova D.I.

Identification of microorganisms using gas chromatography-mass spectrometry 356

SCIENCE AND PRACTICE

Feldblum I.V., Subbotina K.A., Rychkova O.A., Mironov A.N., Volkova D.A., Metov A.O., Sakaeva I.V., Kupina N.V., Karbyshev M.S., Mironov N.A., Kondratyeva Ya.Yu.

Reactogenicity, safety and immunological efficacy of the live, pentavalent rotavirus vaccine in childhood immunization (results of the multicenter clinical trial)* 363

Kukarkina V.A., Golubkova A.A., Podymova A.S.

Modern practices of immunizing children exposed to HIV and HIV-infected 375

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

** The article is published in Russian and English on the journal's website and in the printed edition.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Асатрян М.Н., Герасимук Э.Р., Логунов Д.Ю., Семенов Т.А., Гинцбург А.Л., 2020



Прогнозирование динамики заболеваемости COVID-19 и планирование мероприятий по вакцинопрофилактике населения Москвы на основе математического моделирования

Асатрян М.Н.^{1✉}, Герасимук Э.Р.², Логунов Д.Ю.¹, Семенов Т.А.¹, Гинцбург А.Л.¹

¹ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи», 123098, Москва, Россия;

²Государственный университет «Дубна», 141982, Дубна, Россия

Введение. Распространение вируса SARS-CoV-2 продолжается во всем мире. Большие надежды возлагаются на вакцины, которые разрабатываются во многих ведущих научных центрах мира, в том числе в России.

Цель исследования — с помощью разработанной эпидемиологической модели провести анализ и прогноз динамики заболеваемости COVID-19 на территории Москвы и определить основные подходы к организации противозидемических мероприятий (ПЭМ) с учетом вакцинации населения на сезон 2020/2021 гг.

Материалы и методы. Эпидемиологическая модель разработана на базе отечественной теории математического моделирования эпидемий «Эпиддинамика». Прогнозную оценку на среднесрочный период проводили на основе прогнозных сценариев развития эпидемической ситуации при различных изменениях ПЭМ (по изоляции инфицированных и контактных лиц, прерыванию механизма передачи), в том числе с учетом различных объемов вакцинации населения Москвы.

Результаты и обсуждение. Вычислительные эксперименты показали, что существует вероятность подъема заболеваемости при ослаблении ПЭМ в отсутствие вакцинации населения. При этом высота пика ежедневной заболеваемости зависит от степени снижения ПЭМ и практически не зависит от времени начала их снижения. Проведение вакцинации на фоне ослабления ПЭМ позволяет снизить заболеваемость, однако степень влияния зависит от времени начала, объема и скорости охвата населения вакцинацией.

Заключение. Результаты вычислительных экспериментов показали, что для предотвращения значительного подъема заболеваемости COVID-19 на фоне проводимой вакцинации необходимо поддерживать остальные ПЭМ до достижения объема охвата вакцинацией около 2 млн человек. Оптимальным представляется сохранение мер по изоляции и прерыванию механизма передачи до достижения суммарного объема охвата вакцинацией 4 млн человек, после которого возможно значительное ослабление ограничительных мер; при охвате вакцинацией 50% населения Москвы возможна их полная отмена.

Ключевые слова: COVID-19; SARS-CoV-2; эпидемический процесс; эпидемиологическая модель; прогнозные сценарии; противозидемические мероприятия; прогнозно-аналитические исследования.

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: Асатрян М.Н., Герасимук Э.Р., Логунов Д.Ю., Семенов Т.А., Гинцбург А.Л. Прогнозирование динамики заболеваемости COVID-19 и планирование мероприятий по вакцинопрофилактике населения Москвы на основе математического моделирования. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(4): 289–302.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-1>

Поступила 06.08.2020
Принята в печать 17.08.2020

Predicting the dynamics of Covid-19 incidence and planning preventive vaccination measures for Moscow population based on mathematical modeling

Marina N. Asatryan^{1✉}, Elita R. Gerasimuk², Denis Yu. Logunov¹,
Tatyana A. Semenenko¹, Aleksander L. Gintsburg¹

¹N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology, 123098, Moscow, Russia;

²Dubna State University, 141982, Dubna, Russia

The results of the predictive analytical studies on Covid-19 incidence dynamics in Moscow, taking into account different changes in epidemic prevention measures, including vaccination coverage of the population, are presented.

Research Objective. Using the new epidemiological model for analysis and prediction of the Covid-19 incidence dynamics in Moscow and outlining main strategies in implementing epidemic prevention measures (EPMs), including vaccination in 2020/2021.

Materials and methods. The epidemiological model is based on the Russian approach to mathematical modeling of epidemics, known as Epidynamics. The medium-term forecasting incorporated probable scenarios of epidemic development with different EPMs (isolation of the infected and contacts, breaking the transmission chains), including different rates of vaccination coverage in Moscow.

Results and discussion. The computational simulations demonstrated that the incidence rate is likely to increase with scaling down EPMs and zero vaccination coverage. At the same time, the daily incidence rate depends on the degree of EPMs reduction and basically does not depend on the time when the reduction begins. With scaled-down EPMs, vaccination can decrease the incidence, though its effectiveness will depend on the time of its commencement, coverage and rate.

Conclusion. The computational simulations showed that the vaccination will be efficient for prevention of new surges in COVID-19 cases only if the other EPMs (isolation of the infected and contacts, breaking the transmission chains) are still in place until the vaccination coverage reaches about 2 million people. Ideally, the measures aimed at isolation and breaking of transmission chains should be continued until the total vaccination coverage reaches 4 million people, after which the restrictive measures can be scaled down significantly. With vaccination coverage of 50% of the population of Moscow, the restrictive measures can be completely discontinued.

Keywords: Covid-19, SARS-CoV-2, epidemic process, epidemiological model, potential scenarios, epidemic prevention measures, predictive analytical studies.

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: Asatryan M.N., Gerasimuk E.R., Logunov D.Yu., Semenenko T.A., Gintsburg A.L. [Predicting the dynamics of Covid-19 incidence and planning preventive vaccination measures for Moscow population based on mathematical modeling]. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(4): 289–302. (In Russ.).
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-1>

Received 6 August 2020

Accepted 17 August 2020

*Посвящается памяти
д.т.н. Боева Бориса Васильевича*

Введение

Проблема возникновения эпидемий и пандемий инфекционных заболеваний и поиск мер по их предотвращению никогда не потеряют свою актуальность. Об этом в 2005 г. писал заведующий лабораторией эпидемиологической кибернетики НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи д.т.н. Б.В. Боев: «Согласно прогнозам, в первой половине текущего века в любой географической точке планеты следует ожидать эпидемии или вспышки как «новых», так и «старых» инфекционных заболеваний. В этих условиях особое значение приобретают опережающие научные исследования по анализу и прогнозу вероятных сценариев развития эпидемий опасных инфекционных заболеваний, которые могут появиться в результате чрезвычайных ситуаций природного и техногенного характера» [1].

После первых сообщений в декабре 2019 г. о вспышке заболеваний пневмонией в Ухане (КНР) новый коронавирус быстро распространился по всем странам и континентам. К началу августа 2020 г. количество зарегистрированных случаев инфицирования SARS-CoV-2 составило более 18 млн, погибло по причинам, связанным с коронавирусом, более 688 тыс. человек. В России, благодаря введенным противоэпидемическим мерам, удалось значительно уменьшить скорость распространения вируса. Тем не менее, по данным официальной статистики, к началу августа 2020 г. в России выявлено более 850 тыс. инфицированных SARS-CoV-2 и зафиксировано 14 тыс. летальных случаев. Однако зарегистрированное количество инфицированных лиц представляет собой лишь часть их реального числа. Доля невыявленных инфицированных лиц,

по оценкам различных исследований, может составлять от 11,6 до 35,8% [2–5].

Распространение вируса SARS-CoV-2 продолжается во всем мире. Большие надежды возлагаются на вакцины, которые разрабатываются во многих ведущих научных центрах мира, в том числе в России^{1,2}. Новая вакцина от коронавируса, разработанная в Национальном центре эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, уже успешно прошла этап клинических испытаний, после которого планируется наладить промышленное производство и начать проведение вакцинации населения.

Применение адекватной эпидемиологической модели позволяет «восстановить» данные по заболеваемости и на их основе провести вычислительные эксперименты на компьютере по различным вариантам развития эпидемической ситуации. В этой связи представляется актуальным проведение прогнозно-аналитических исследований на основе разработанной математической модели распространения SARS-CoV-2 с целью поиска наиболее приемлемых сценариев противоэпидемических мероприятий (ПЭМ) с учетом вакцинации населения.

Цель исследования — с помощью эпидемиологической модели провести анализ и прогноз динамики заболеваемости COVID-19 на территории Москвы и определить основные подходы к организации ПЭМ с учетом вакцинации населения на сезон 2020/2021 гг.

Материалы и методы

При разработке эпидемиологической модели использованы доступные публикации об особенностях клиники, патогенеза и эпидемиологии COVID-19; статистические данные о регистрации заболеваемости COVID-19 и количестве летальных случаев в Москве за период наблюдения³; сведения Росстата о численности населения Москвы (12,678 млн человек)⁴.

Была применена детерминированная математическая модель, разработанная на базе теории «Эпиддинамика», которая позволяет на основе

данных о закономерностях развития инфекционного процесса (среди индивидуумов) получить представление о динамике эпидемического процесса в популяции [6]. На основе теории «Эпиддинамика» были успешно реализованы математические модели для изучения распространения значимых инфекционных и неинфекционных заболеваний [7–11].

За основу была взята модель типа SEIRF, которая описывает динамику «потока» лиц по соответствующим стадиям-состояниям: восприимчивые (S), в инкубационной стадии (E), в инфекционной стадии (I), с исходами болезни — реконвалесценция (R) или смерть (F). Для моделирования были определены следующие длительности стадий: инкубация — 2–14 дней, клиническая (инфекционная) стадия — 7–14 дней [12]. Вероятность перехода индивидуума в следующую стадию задается функциями: $\gamma(\tau)$ — функция развития периода инкубации; $\delta(\tau)$ — функция развития инфекционного периода. Математическая модель развития эпидемии имеет вид системы нелинейных интегро-дифференциальных уравнений в частных производных с начальными и граничными условиями [1]. Модель успешно верифицирована на статистических данных о заболеваемости (с учетом «восстановленных» данных). В модели не учитывались сезонные изменения вирулентности вируса, а также сделано предположение о том, что вирус существенно не мутирует за сезон 2020/2021 гг. При разработке прогнозных сценариев с учетом использования новой вакцины сделано предположение о 70% иммунологической эффективности.

Исследования проводились в несколько этапов:

1. Проведение процедуры «восстановления» данных о заболеваемости COVID-19 и выбор базового сценария.
2. Прогнозно-аналитические исследования, включающие:
 - 2.1. Анализ и прогноз текущей эпидемической ситуации (по базовому сценарию).
 - 2.2. Вычислительные эксперименты, проведенные по прогнозным сценариям.

На заключительном этапе проведена интерпретация полученных результатов и сделаны выводы.

Результаты и обсуждение

«Восстановление» данных о заболеваемости и выбор базового сценария

Особенностью новой коронавирусной инфекции является наличие случаев бессимптомного и легкого течения, что способствует передаче инфекции в популяции [13]. Если больные с тяжелым течением и средней тяжести регистрируются в связи с обращением в лечебные учреждения, то лица с легким и бессимптомным течением могут не обратиться за помощью. До проведения широкомас-

¹ Официальный сайт Министерства здравоохранения по COVID-19 в России. URL: <https://covid19.rosminzdrav.ru/mihail-murashko-17-vakczin-protiv-koronavirusa-pokazali-sebua-kak-perspektivnye/> (дата обращения 20.07.2020).

² ВОЗ. Временные рекомендации. Механизм для принятия решений при проведении кампаний массовой вакцинации в условиях COVID-19. 20.05.2020. URL: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/332159/WHO-2019-nCoV-Frame-work_Mass_Vaccination-2020.1-rus.pdf (дата обращения 20.07.2020).

³ Стопкоронавирус.рф. Отчеты Коммуникационного центра Правительства РФ по ситуации с коронавирусом. URL: <https://стопкоронавирус.рф/info/ofdoc/reports> (дата обращения 20.07.2020).

⁴ Федеральная служба государственной статистики. URL: <https://gks.ru> (дата обращения 20.07.2020).

штабных сероэпидемиологических исследований лишь небольшая часть бессимптомных лиц могла быть выявлена при тщательном эпидемиологическом расследовании контактов [14]. Таким образом, количество зарегистрированных случаев представляет собой лишь «видимую часть айсберга», а для правильной трактовки эпидемической ситуации требуется иметь полную картину заболеваемости. Поэтому первый этап наших исследований заключался в проведении расчетов по «восстановлению» исходных данных.

«Восстановление» данных заболеваемости COVID-19 среди населения Москвы проведено на основании расчетов по двум показателям, которые затем сравнивали:

1) по оценке верхней и нижней границы летальности от COVID-19 (Infection-Fatality Rate — IFR);

2) по оценке иммунной прослойки населения Москвы, основанной на исследовании репрезентативной выборки.

По данным систематического обзора литературы и метаанализа результатов исследований Г. Meyerowitz-Katz и соавт. [15] был определен IFR. В отличие от показателя CFR (Case-Fatality Rate), который соответствует отношению количества летальных случаев к количеству зарегистрированных (выявленных) случаев заболевания, IFR вычисляется как отношение количества летальных случаев от инфекции к количеству всех инфицированных лиц (включая бессимптомные и легкие случаи инфекции). Показатель летальности IFR в европейских странах составил в среднем 0,64% с доверительным интервалом (ДИ) 0,50–0,78% [15].

Данные оперативного штаба о летальных случаях в Москве соответствуют количеству умерших с основной причиной смерти COVID-19⁵. В соответствии с международными методическими рекомендациями по удостоверению и кодированию COVID-19 в качестве причины смерти⁶ исходные данные были пересчитаны с учетом случаев, когда вирус SARS-CoV-2 оказал существенное влияние на развитие смертельных осложнений заболевания^{7,8}.

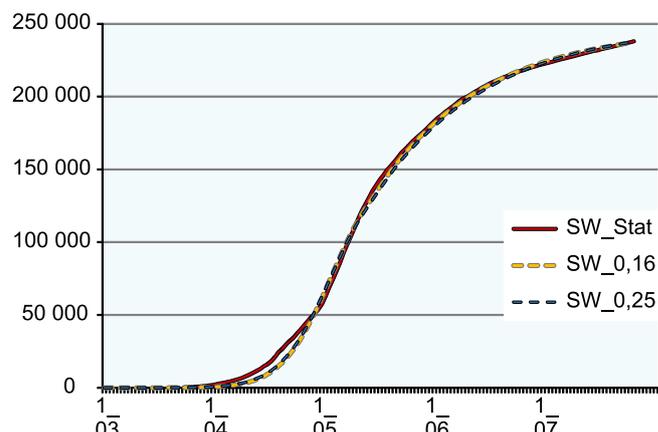


Рис. 1. Результат верификации модели — сравнение модельных (SW_0,16; SW_0,25) и статистических данных кумулятивной заболеваемости (выявленные случаи, SW_Stat).

Здесь и на рис. 2–10: по оси абсцисс — даты; по оси ординат — число случаев.

Fig. 1. The result of model verification is a comparison of models (SW_0,16; SW_0,25) and statistical data on cumulative morbidity (detected cases, SW_Stat).

Here and in Figs. 2–9: the horizontal axis shows the dates; the vertical axis shows the number of cases.

В результате расчетов в соответствии с данными Росстата⁹ получается, что количество летальных случаев за апрель 2020 г. составило $850 + 360 = 1165$, за май 2020 г. — $2757 + 980 = 3737$. С учетом того, что за март 2020 г. количество летальных случаев на несколько порядков ниже, чем в апреле и в мае (без относительного разделения на причины), для расчетов были взяты данные оперативного штаба в количестве 24 случаев. Таким образом, суммарное количество летальных случаев с момента официальной регистрации до 01.06.2020 составило 4926.

Взяв за основу количество летальных случаев на 01.06.2020, мы провели расчеты с помощью модели с целью поиска отношения числа выявленных случаев заболевания к «восстановленным», при которых расчетное (модельное) количество летальных случаев на 01.06.2020 будет наиболее близким к 4926. Для верхней границы показателя летальности (IFR = 0,78%) отношение выявленных (зарегистрированных) случаев по официальной статистике к «восстановленным» данным составляет примерно 25%, или 1 : 4. Например, кумулятивная заболеваемость на 01.06.2020 составляет по модели 718 687 человек, а данные официальной статистики — 183 088. Для нижней границы показателя летальности (IFR = 0,50%) отношение выявленных (общаемых) случаев по официальной статистике к

⁵ Официальный сайт Министерства здравоохранения по COVID-19 в России. URL: https://static-1.rosminzdrav.ru/system/attachments/attaches/000/050/527/original/27052020_MR_STAT_1.pdf (дата обращения 20.07.2020).

⁶ ВОЗ. Международные методические рекомендации по удостоверению и кодированию COVID-19 в качестве причины смерти. 20.04.2020. URL: https://www.who.int/classifications/icd/Guidelines_Cause_of_Death_COVID-19-20200420-RU.pdf?ua=1 (дата обращения 20.07.2020).

⁷ Официальный сайт Министерства здравоохранения по COVID-19 в России. URL: <https://mosgorzdrav.ru/professional/covid-19> (дата обращения 20.07.2020).

⁸ WHO. Media briefing on #COVID19 with @DrTedros. 10.06.2020. URL: <https://twitter.com/WHO/status/1270739116078981120> (дата обращения 20.07.2020).

⁹ Естественное движение населения в разрезе субъектов Российской Федерации за январь–май 2020 года. URL: <https://rosstat.gov.ru/storage/mediabank/yjmHZNUV/edn05-2020.htm> (дата обращения 20.07.2020).

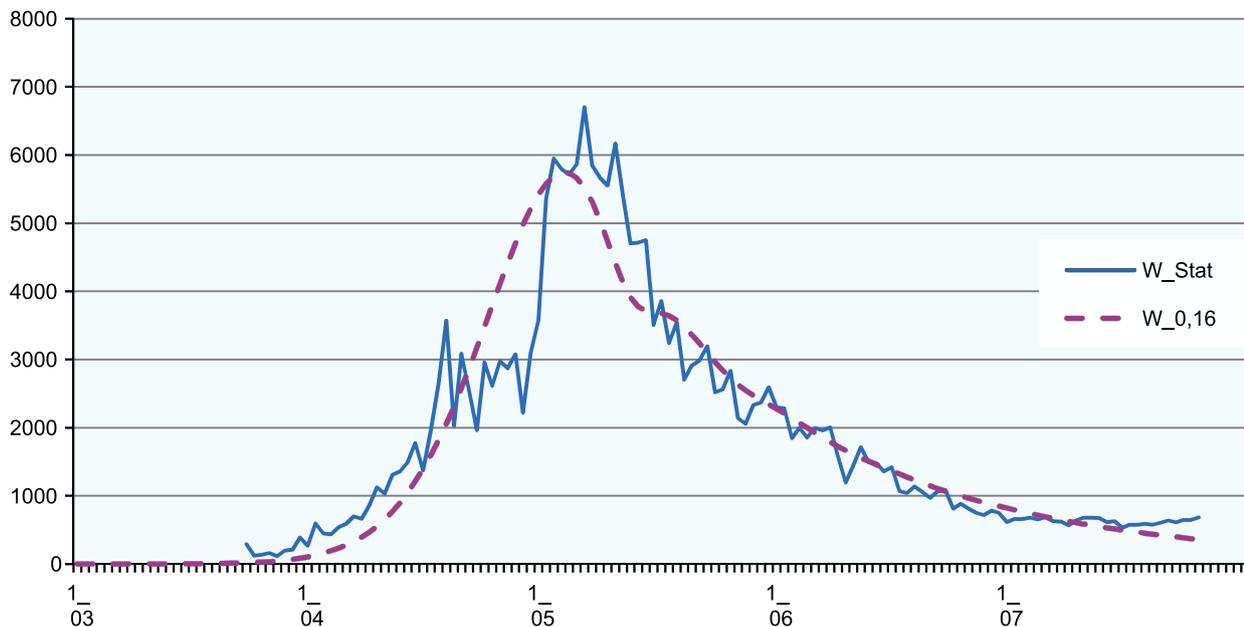


Рис. 2. Выявленные (зарегистрированные) случаи ежедневной заболеваемости. Статистические данные — W_Stat, модельные — W_0,16.

Fig. 2. Detected (reported) cases of daily incidence. Statistical data — W_Stat, model — W_0,16.

«восстановленным» с помощью модели данным — примерно 16%, или 1 : 6. Например, кумулятивная заболеваемость на 01.06.2020 составляет по модели 1 134 836 человек, а данные официальной статистики — 183 088.

Кривая верифицированной кумулятивной заболеваемости (выявленные случаи) для двух вариантов расчетов (1 : 6 и 1 : 4) хорошо совпадает с кривой официальной статистики (рис. 1).

Следующим этапом расчетов для обоснования и выбора «базового» сценария из двух верифицированных стал анализ результатов тестов на определение антител в рандомизированных выборочных исследованиях, которые проводились в Москве с 15 по 23 мая 2020 г. Согласно официальным источникам и сообщениям пресс-службы Правительства Москвы, по результатам этого исследования вируснейтрализующие антитела к SARS-CoV-2 были определены у 12,5% населения города¹⁰ [16]. С учетом информации о специфичности и чувствительности использованных тест-систем был получен «расчетный» показатель доли инфицированного населения. Для этого из заявленной доли 12,5% были вычтены возможные ложноположительные случаи (3,8%) и добавлены ложноотрицательные случаи (0,2%), в итоге получилось 8,9% населения Москвы, или

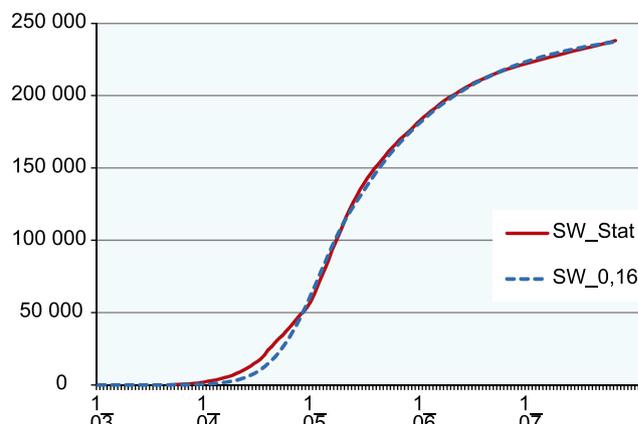


Рис. 3. Выявленные (зарегистрированные) случаи кумулятивной заболеваемости.

Статистические данные — SW_Stat, модельные — SW_0,16.
Fig. 3. Detected (reported) cases of cumulative incidence. Statistical data — SW_Stat, model — SW_0,16.

1130 тыс. человек¹¹. Эта оценка близка к результатам расчетов отношения выявленных случаев к «восстановленным» данным по кумулятивной заболеваемости, которая составляет 1 : 6 (IFR = 0,50%).

Таким образом, для дальнейших исследований в качестве «базового» выбран сценарий с показателем летальности 0,50%, который был обозначен как сценарий C0. На рис. 2, 3 приведены графики со-

¹⁰ Официальный портал Мэра и Правительства Москвы. Иммуитет к коронавирусу формируется у 12,5 процента москвичей. URL: <https://www.mos.ru/news/item/74512073/> (дата обращения 20.07.2020).

¹¹ SARS-CoV-2 IgM. URL: <https://keul.de/wp-content/uploads/2020/04/IFU-SARS-CoV-2-IgM-CLIA-1.0.pdf> (дата обращения 20.07.2020).

ответствия модельных и статистических данных по зарегистрированной ежедневной и кумулятивной заболеваемости.

В соответствии с результатом расчетов отношение выявленных случаев к «восстановленным» данным по кумулятивной заболеваемости составило 1 : 6. На **рис. 4** представлены результаты моделирования динамики «восстановленной» кумулятивной заболеваемости и для сравнения приведен график выявленных (зарегистрированных) случаев. Дальнейшие исследования проводились на основе «восстановленных» данных по базовому сценарию C0.

Прогнозно-аналитические исследования

Анализ и прогноз текущей эпидемической ситуации по базовому сценарию (сценарий 1 : 6)

Использование математической модели позволяет «проиграть» (на компьютере) различные сценарии развития эпидемии, которые дают возможность ответить как на естественный для исследователя

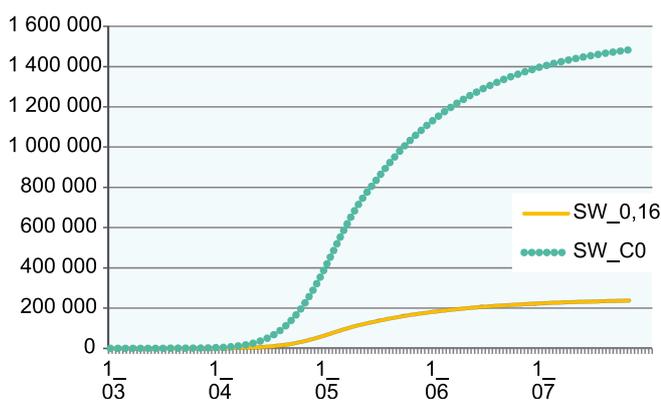


Рис. 4. Выявленная (зарегистрированные случаи) (SW_0,16) и «восстановленная» кумулятивная заболеваемость в соответствии с выбранным базовым сценарием C0 (SW_C0).

Fig. 4. Detected (reported cases) (SW_0,16) and «recovered» cumulative incidence in accordance with the selected baseline scenario C0 (SW_C0).

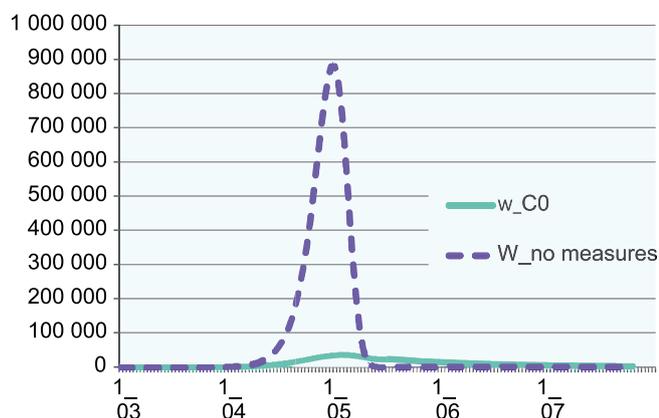


Рис. 5. Сравнение текущей ежедневной заболеваемости (W_C0) и гипотетической (без мер, W_no measures).

Fig. 5. Comparison of the current daily morbidity (W_C0) and the hypothetical (without measures, W_no measures).

вопрос: «что будет, если...», так и на риторический вопрос: «что было бы, если...». Последний вопрос оказывается тоже полезным, т.к. позволяет оценить предпринятые системой здравоохранения меры и сравнить текущую ситуацию с гипотетически вероятным сценарием развития эпидемии без предпринятых мер.

На **рис. 5** представлены графики ежедневной заболеваемости без введения мер противодействия и при реализованных ПЭМ. Введенные вовремя меры по изоляции инфицированных лиц (включая самоизоляцию населения) и социальному дистанцированию позволили существенно снизить ежедневную заболеваемость (примерно в 25 раз) и сохранить десятки тысяч жизней.

Проведенная идентификация параметров модели показала, что для сценария C0, обозначенного как «базовый», ПЭМ, достигнутые к 12.06.2020, соответствуют следующим показателям: меры по изоляции на уровне 67% (доля от всех лиц в инфекционной (заразной) стадии); меры, направленные на прерывание механизма передачи (гигиенические мероприятия на всех социально значимых объектах, социальное дистанцирование, ношение масок и перчаток, личная гигиена) снизили вероятность передачи вируса до 14% от максимального значения (вероятность передачи до введения ограничительных мер). В соответствии с осуществлением этапов снятия ПЭМ (с сохранением социального дистанцирования и ношения масок) и предположением о повышении деловой активности в сентябре 2020 г. при моделировании мы сделали допущение о незначительном (и постепенном) ослаблении мер в период с 12 июня до 25 сентября 2020 г.^{12,13} Дата 25.09.2020 определена условно как вероятное начало проведения вакцинации населения г. Москвы¹⁴. При условии сохранения в дальнейшем уровня мер противодействия, достигнутого к 25.09.2020, ежедневная заболеваемость будет снижаться, составив лишь единичные случаи после января 2021 г. (**рис. 6**). Кумулятивное количество инфицированных лиц может составить 1,558 млн человек, а ку-

¹² Методические рекомендации от 08.05.2020 № МР 3.1.0178-20 «Определение комплекса мероприятий, а также показателей, являющихся основанием для поэтапного снятия ограничительных мероприятий в условиях эпидемического распространения COVID-19». URL: https://www.rospotrebnadzor.ru/upload/MP_поэтапное%20снятие%20огранич._08.05.2020.pdf (дата обращения 20.07.2020).

¹³ Сайт Сергея Собянина. Возвращение к нормальной жизни. Образование, театры, кино и детские развлекательные центры. URL: <https://www.sobyanin.ru/otmena-ogranicheniy-obrazovaniya-i-detskie-tsentry> (дата обращения 20.07.2020).

¹⁴ Умеренное снижение мер одновременно с началом вакцинации, например, с 25.11.2020, показывает аналогичные результаты моделирования.

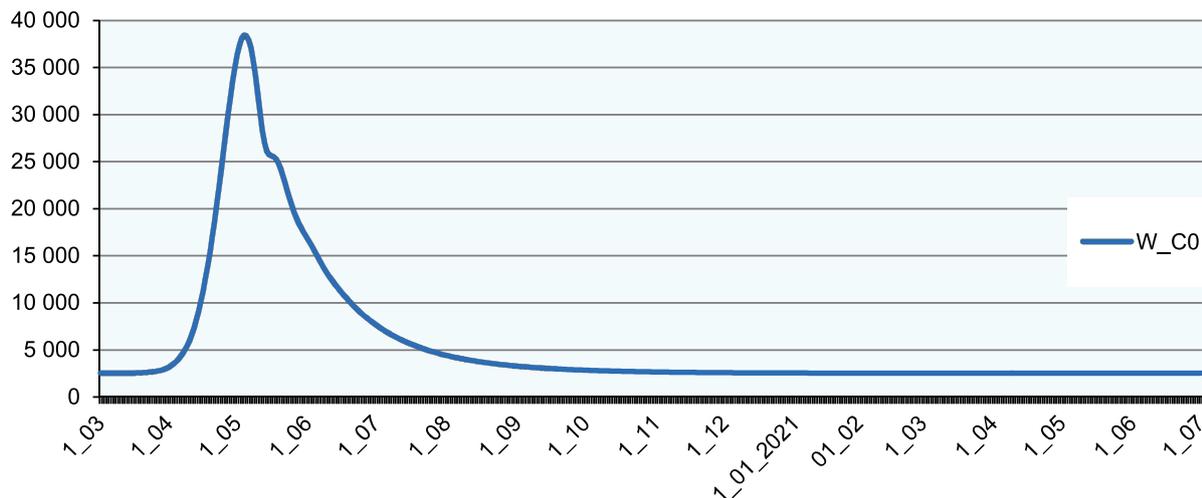


Рис. 6. Динамика ежедневного количества инфицированных лиц по базовому сценарию C0 (W_CO).
Fig. 6. Dynamics of the daily number of infected cases according to the C0 baseline scenario (W_CO).

мультипликативное количество смертельных случаев при таком сценарии не превышает 8 тыс.

Сценарий C0 показывает, что при сохранении достигнутых ПЭМ в течение продолжительного времени заболеваемость можно удерживать на достаточно низком уровне. Но что будет, если при достижении низкого уровня заболеваемости ослабить меры? Для ответа на этот вопрос мы провели вычислительные эксперименты по прогнозным сценариям.

Вычислительные эксперименты по прогнозным сценариям

Для ограничения распространения инфекции основные ПЭМ должны быть направлены на 3 фактора (движущие силы) эпидемического процесса:

- источник инфекции (изоляция больных в заразной стадии);
- механизм передачи инфекции (прерывание основных путей передачи, включающее гигиенические мероприятия на всех социально значимых объектах, социальное дистанцирование, ношение масок и перчаток, усиление личной гигиены);
- восприимчивых лиц (плановая вакцинация, экстренная профилактика)¹⁵ [17].

Реальная ситуация складывалась таким образом, что основные меры до разработки новой вакцины были направлены на 2 фактора — источник инфекции и механизм передачи. Как показывает моделирование, введенные вовремя ограничитель-

ные меры позволили значительно снизить заболеваемость (рис. 5).

Успешно проведенные клинические испытания новой отечественной вакцины на добровольцах позволяют с уверенностью планировать меры с учетом вакцинации населения. Можно ли при этом ослаблять меры противодействия, в каком объеме и какими темпами следует проводить вакцинацию? При каких условиях можно снижать меры без риска резкого подъема заболеваемости? Для ответа на поставленные вопросы мы разработали прогнозные сценарии развития эпидемической ситуации COVID-19 при различных изменениях ПЭМ, в том числе с учетом проведения различных объемов вакцинации населения Москвы (с началом вакцинации с 25.09.2020), и провели вычислительные эксперименты с моделью (табл. 1).

Уровни ослабления мер противодействия в таблице определены терминами: «незначительное», «умеренное» и «значительное», которые соответствуют следующим показателям:

- незначительное снижение мер — в среднем на 2% от достигнутого к 12.06.2020 уровня;
- умеренное снижение мер — в среднем на 13% от достигнутого к 25.09.2020 уровня;
- значительное снижение мер — в среднем на 50% от достигнутого к 25.09.2020 уровня.

Прогнозные сценарии с различным уровнем снижения ПЭМ без вакцинации населения

Результаты моделирования по прогнозным сценариям C1.0, C2.0, C3.0 (без вакцинации) представлены на рис. 7.

Сценарий C1.0 иллюстрирует ситуацию, когда на фоне единичных случаев заболевания (практически могут не регистрироваться даже единичные случаи к концу февраля) к завершению подъема заболеваемости сезонными ОРВИ снимаются

¹⁵ Методические рекомендации МР 3.1.0170-20 «Эпидемиология и профилактика COVID-19» (в редакции МР 3.1.0175-20 «Изменения № 1 в МР 3.1.0170-20 «Эпидемиология и профилактика COVID-19», утв. Роспотребнадзором 30.04.2020). URL: https://www.rosпотребнадзор.ru/upload/iblock/070/metod_recomend_3.1.0170_20_v_1.pdf (дата обращения 20.07.2020).

Таблица 1. Прогнозные сценарии — варианты комплекса ПЭМ**Table 1.** Forecast scenarios — options for a complex of anti-epidemic measures

Сценарии Scenarios	Изоляция инфицированных лиц и прерывание механизма передачи (гигиенические мероприятия на всех социально значимых объектах, социальное дистанцирование, ношение масок и перчаток, усиление личной гигиены) Isolation of infected persons and interruption of the transmission mechanism (hygiene measures at all socially significant facilities, social distancing, wearing masks and gloves, strengthening of personal hygiene)	Объем и скорость вакцинации* (суммарный объем, достигнутый на дату 01.01.21 — 01.04.21 — 21.10.21) Vaccination volume and rate* (total volume reached on the date 01.01.21 — 01.04.21 — 21.10.21)
Сценарий С0 «базовый» (рис. 6) Scenario C0 «Basic» (Fig. 6)	<i>Незначительное</i> снижение ПЭМ с 12 июня до сентября 2020 г. с последующим поддержанием их на достигнутом уровне <i>A slight</i> decrease in measures from June 12 to September 2020, followed by their maintenance at the achieved level	Вакцинация не проводится No vaccination
Сценарий С1.0 (рис. 7) Scenario C1.0 (Fig. 7)	<i>Значительное</i> снижение ПЭМ с марта 2021 г. <i>Significant</i> reduction in measures from March 2021	Вакцинация не проводится No vaccination
Сценарий С1.1 (рис. 8) Scenario C1.1 (Fig. 8)	<i>Значительное</i> снижение ПЭМ с марта 2021 г. <i>Significant</i> reduction in measures from March 2021	2 млн — 4 млн — 6,5 млн 2M — 4M — 6.5M
Сценарий С1.2 (рис. 8) Scenario C1.2 (Fig. 8)	<i>Значительное</i> снижение ПЭМ с марта 2021 г. <i>Significant</i> reduction in measures from March 2021	300 тыс. — 2 млн — 6,5 млн 300k — 2M — 6.5M
Сценарий С2.0 (рис. 7) Scenario C2.0 (Fig. 7)	<i>Умеренное</i> снижение ПЭМ с сентября 2020 г.* <i>Moderate</i> reduction in measures from September 2020*	Вакцинация не проводится No vaccination
Сценарий С2.1 (рис. 9) Scenario C2.1 (Fig. 9)	<i>Умеренное</i> снижение ПЭМ с сентября 2020 г.* <i>Moderate</i> reduction in measures from September 2020*	2 млн — 4 млн — 6,35 млн 2M — 4M — 6.35M
Сценарий С2.2 (рис. 9) Scenario C2.2 (Fig. 9)	<i>Умеренное</i> снижение ПЭМ с сентября 2020 г.* <i>Moderate</i> reduction in measures from September 2020*	300 тыс. — 2 млн — 4,3 млн 300k — 2M — 4.3M
Сценарий С3.0 (рис. 7) Scenario C3.0 (Fig. 7)	<i>Значительное</i> снижение ПЭМ с сентября 2020 г.* <i>Significant</i> reduction in measures from September 2020*	Вакцинация не проводится No vaccination
Сценарий С3.1 (рис. 10) Scenario C3.1 (Fig. 10)	<i>Значительное</i> снижение ПЭМ с сентября 2020 г.* <i>Significant</i> reduction in measures from September 2020*	2 млн — 2,3 млн — 2,3 млн 2M — 2.3M — 2.3M

Примечание. *Начало изменения ПЭМ совпадает с началом вакцинации — 25.09.2020.

Note. *The beginning of the change in measures coincides with the beginning of vaccination — 25.09.2020.

ограничительные меры, например, начиная с марта 2021 г., что равнозначно значительному снижению ПЭМ. При таких условиях и отсутствии вакцинации имеется высокая вероятность нового подъема заболеваемости с пиком (380 тыс.) к середине августа 2021 г. (рис. 7, W_C1.0).

Сценарий С2.0 иллюстрирует вероятность подъема заболеваемости (с пиком 65 тыс. в середине июня 2021 г.) при умеренном снижении ПЭМ с конца сентября по январь 2021 г. и отсутствии вакцинации (рис. 7, W_C2.0).

Сценарий С3.0 иллюстрирует вероятность подъема заболеваемости (с пиком 360 тыс. в первых числах января 2021 г.) при значительном снижении ПЭМ с конца сентября по январь 2021 г. и отсутствии вакцинации (рис. 7, W_C3.0).

Таким образом, вычислительные эксперименты показали, что существует вероятность подъема заболеваемости при ослаблении ПЭМ в отсутствие вакцинации населения. При этом высота пика ежедневной заболеваемости зависит от степени снижения ПЭМ и практически не зависит от времени начала снижения мер. Следующий этап исследований

связан с поиском объема и скорости охвата вакцинацией населения для предотвращения резкого подъема заболеваемости.

Прогнозные сценарии с различным объемом охвата вакцинацией населения

Сценарий С1.1 соответствует проведению вакцинации населения с 25.09.2020 на фоне сохранения достигнутого уровня мер до начала марта 2021 г. и с последующим значительным снижением ПЭМ. При постепенном увеличении объема охвата вакцинацией населения до 2 млн человек к 01.01.2021, затем увеличивая объем до 4 млн к началу апреля 2021 г. и постепенно достигая объема 6,5 млн к концу августа 2021 г., удастся предотвратить экспоненциальный рост заболеваемости, наблюдаемый при отсутствии вакцинации по сценарию С1.0 (рис. 8, W_C1.1).

Сценарий С1.2 — на фоне значительного ослабления мер по изоляции и прерыванию механизма передачи с марта 2021 г. и при снижении объема охвата вакцинацией (с 25.09.2020) до 300 тыс. человек к 01.01.2021 и до 2 млн к началу апреля 2021 г.,

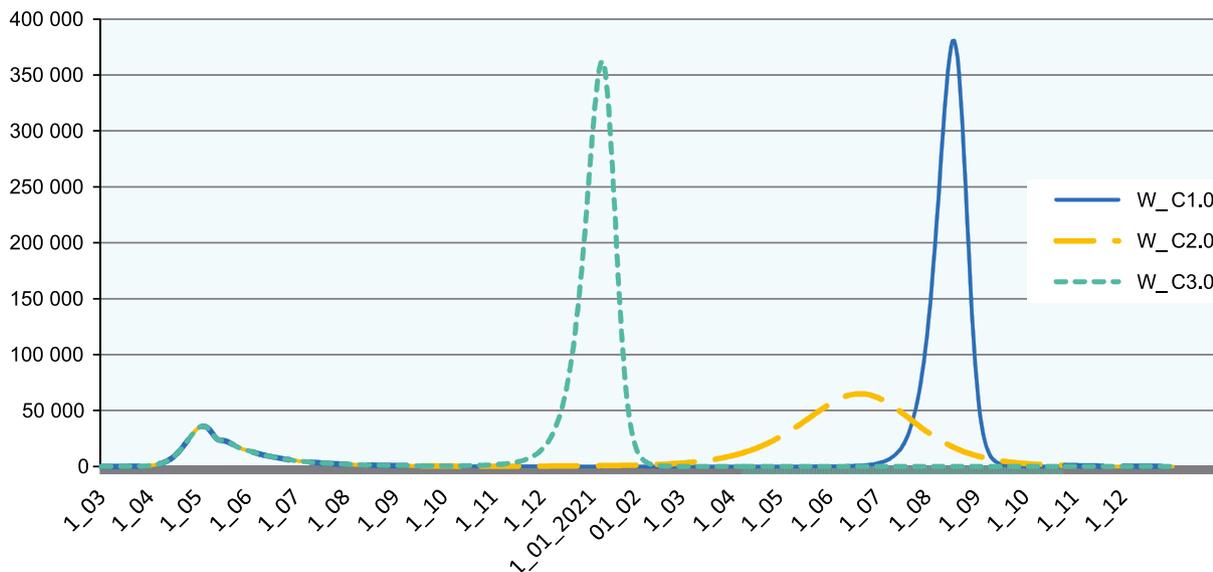


Рис. 7. Результаты моделирования динамики ежедневной заболеваемости по прогнозным сценариям C1.0, C2.0, C3.0 без вакцинации.

Fig. 7. The modeling of the daily incidence dynamics under scenarios C1.0, C2.0, and C3.0 without vaccination.

снижении темпа достижения суммарного объема вакцинации 6,5 млн человек к середине октября 2021 г. полностью предотвратить подъем не удастся и наблюдается появление небольшой второй волны заболеваемости с пиком (11 387 случаев) в середине декабря 2021 г. (рис. 8, W_C1.2).

Таким образом, для предотвращения значительного подъема заболеваемости на фоне проводимой вакцинации необходимо поддерживать остальные ПЭМ (по изоляции инфицированных лиц и прерыванию механизма передачи) до достижения объема охвата вакцинацией по крайней мере 2 млн человек. Сохранение мер (по изоляции и прерыванию меха-

низма передачи) до достижения суммарного охвата вакцинацией 4 млн человек позволяет практически предотвратить появление так называемой второй волны. После достижения объема охвата населения 4 млн человек возможно значительное снижение ПЭМ. При условии дальнейшего продолжения проведения вакцинации до достижения объема охвата 50% населения Москвы возможна полная отмена ПЭМ.

Сценарий C2.1 — при умеренном снижении ПЭМ с конца сентября по январь 2021 г. и проведении вакцинации (с 25.09.2020) с объемом 2 млн человек к 01.01.2021, 4 млн к 01.03.2021 и 6,35 млн к 01.11.2021 наблюдается низкая заболеваемость до

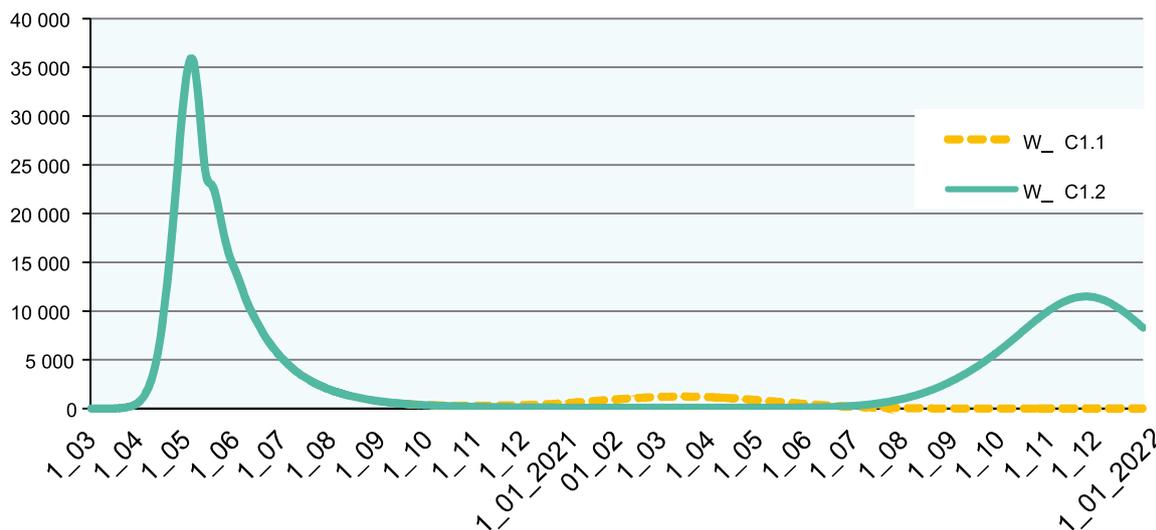


Рис. 8. Сравнение динамики ежедневной заболеваемости по сценариям значительного снижения мер (по изоляции и прерыванию механизма передачи) с марта 2021 г. с разными темпами вакцинации.

Fig. 8. Comparison between the daily incidence dynamics under the scenario of a significant reduction in measures (isolation and breaking chains of transmission) from March 2021 and different rates of vaccination.

01.01.2021, затем незначительный подъем заболеваемости с пиком (1120 человек) в середине марта 2021 г. (рис. 9, W_C2.1).

Сценарий С2.2 — при умеренном снижении ПЭМ с конца сентября по январь 2021 г. и объемом охвата вакцинацией 300 тыс. до 01.01.2021, 2 млн к 01.04.2021 и далее до 4,3 млн к 01.10.2021 приводит к более значимому подъему ежедневной заболеваемости с пиком (18 302 человека) в конце апреля 2021 г. (рис. 9, W_C2.2).

Проведение вакцинации на фоне умеренного ослабления ПЭМ (по изоляции инфицированных лиц и прерыванию механизма передачи) позволяет снизить заболеваемость, однако степень влияния зависит от времени начала, объема и скорости охвата населения вакцинацией.

Сценарий С3.1 — при значительном снижении ПЭМ с конца сентября по январь 2021 г. требуются очень высокие темпы наращивания объема вакцинации в достаточно короткий срок, до начала подъема заболеваемости, т.е. к 300-му дню (01.01.2021). Достижение объема 2 млн человек к 01.01.2021 не позволяет предотвратить экспоненциальный рост заболеваемости с пиком второй волны (220 тыс. человек) к 20.01.2021, такой объем дает возможность лишь снизить пик заболеваемости (с 360 тыс. до 220 тыс. человек) (рис. 10).

Таким образом, значительное ослабление ПЭМ одновременно с началом вакцинации не позволяет избежать существенного роста заболеваемости.

Сводные результаты вычислительных экспериментов по прогнозным сценариям представлены в табл. 2.

При сравнении сценариев С0 и С1.0 вычислительные эксперименты проиллюстрировали ситуацию, когда, казалось бы, эпидемия уже сошла на нет, но при значительном снижении ПЭМ (начиная с марта 2021 г.) при отсутствии вакцинации имеет высокая вероятность значительного подъема заболеваемости с пиком 380 тыс. человек в середине августа 2021 г.

При сравнении сценариев С1.0 и С1.1 вычислительные эксперименты показали, что проведение вакцинации с началом в конце сентября 2020 г. и достижением объема 4 млн человек до начала значительного снижения ПЭМ предотвращает появление второй волны заболеваемости.

При сравнении сценариев С1.0 и С1.2 вычислительные эксперименты показали, что на фоне низкой заболеваемости начало проведения вакцинации в конце сентября 2020 г. с суммарным объемом 6,5 млн человек и более низким начальным темпом вакцинации (300 тыс. — 2 млн — 6,5 млн) не позволяет полностью предотвратить подъем ежедневной заболеваемости с пиком 11 387 случаев в середине декабря 2021 г.

При сравнении сценариев С0 и С2.0 вычислительные эксперименты показали, что на фоне умеренного снижения ПЭМ в сентябре 2020 г. без вакцинации наблюдается низкая заболеваемость до середины ноября 2020 г., затем подъем заболеваемости с пиком 65 300 случаев в середине июня 2021 г.

При сравнении сценариев С2.0 и С2.1 вычислительные эксперименты показали, что на фоне умеренного снижения ПЭМ в сентябре начало про-

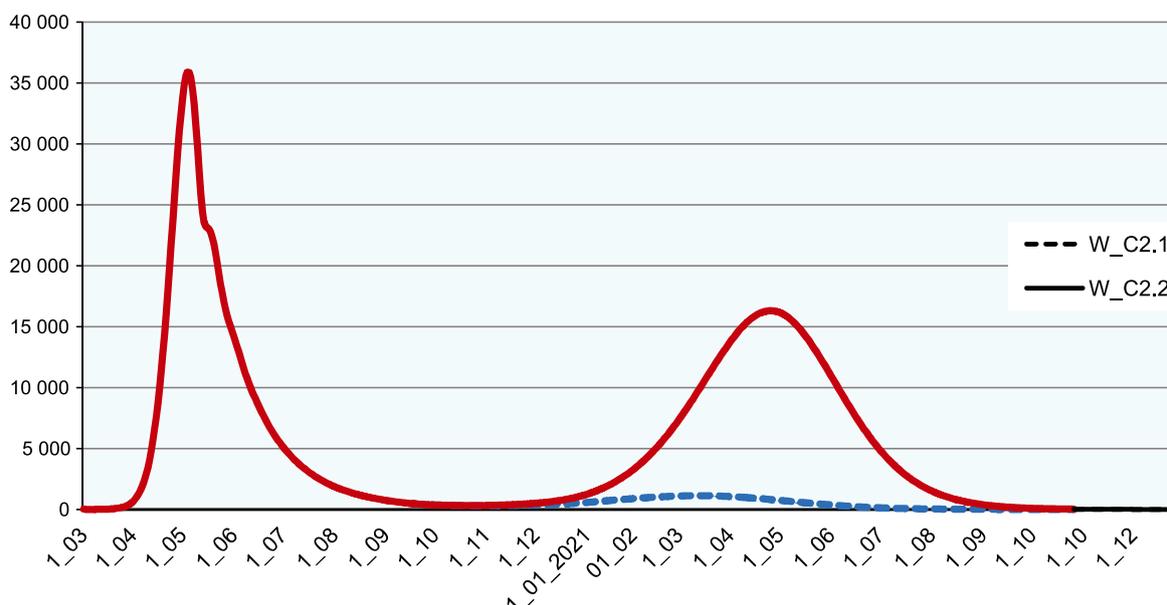


Рис. 9. Сравнение динамики ежедневной заболеваемости по сценариям умеренного снижения ПЭМ с конца сентября по январь 2021 г. с разным темпом проведения вакцинации.

Fig. 9. Comparison between the daily incidence dynamics under the scenario of a moderate reduction in EPMs from the end of September to January 2021 and different rates of vaccination.

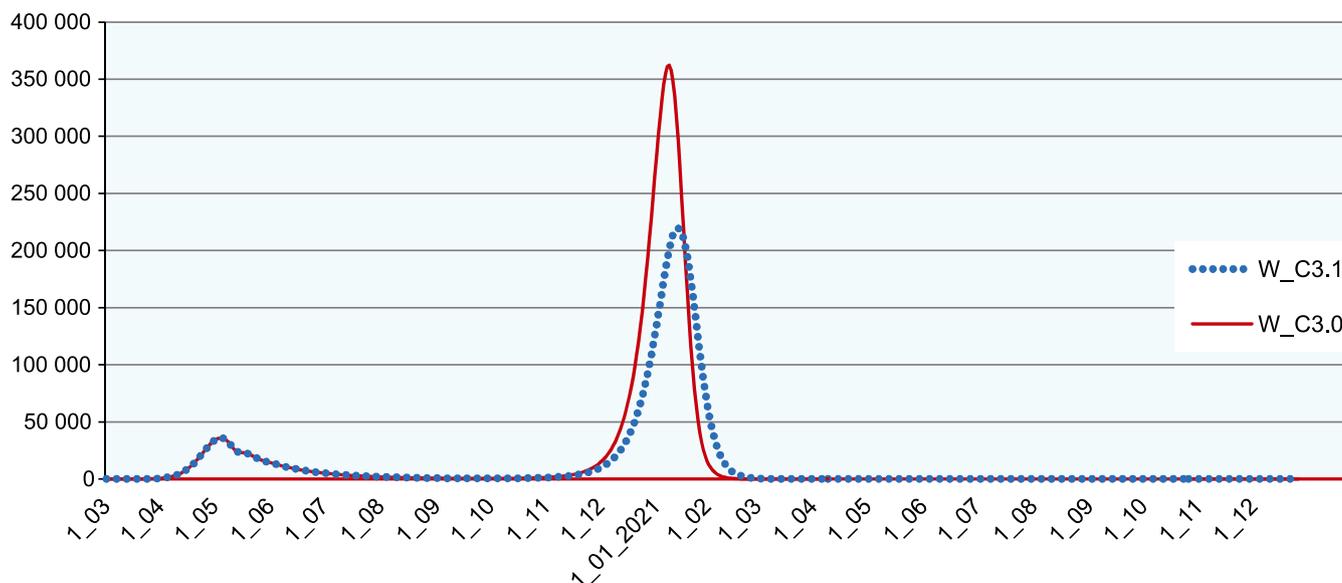


Рис. 10. Сравнение динамики ежедневной заболеваемости по сценарию значительного снижения ПЭМ с конца сентября по январь 2021 г. без вакцинации (W_C3.0) и при проведении вакцинации (W_C3.1).

Fig. 10. Comparison between the daily incidence dynamics under the scenario of a significant reduction in EPMs from late September to January 2021 without vaccination (W_C3.0) and with vaccination (W_C3.1).

ведения вакцинации в конце сентября 2020 г. с суммарным объемом 6,35 млн человек и умеренным темпом вакцинации (2 млн — 4 млн — 6,35 млн) позволит практически предотвратить вторую волну в конце апреля 2021 г. Наблюдается небольшой подъем заболеваемости (1120 случаев) в середине марта 2021 г.

При сравнении сценариев С2.0 и С2.2 вычислительные эксперименты показали, что на фоне умеренного ослабления ПЭМ начало проведения вакцинации в конце сентября с суммарным объемом 4,3 млн человек и более низким начальным темпом вакцинации (300 тыс. — 2 млн — 4,3 млн) позволит снизить заболеваемость. Наблюдается небольшой подъем заболеваемости с пиком (18 302 случая) в конце апреля 2021 г.

При сравнении сценариев С0 и С3.0 вычислительные эксперименты показали, что на фоне значительного снижения ПЭМ в сентябре без вакцинации наблюдается низкая заболеваемость до 01.11.2020, затем экспоненциальный рост ежедневной заболеваемости с пиком (360 тыс. случаев) в начале января 2021 г.

При сравнении сценариев С3.0 и С3.1 вычислительные эксперименты показали, что на фоне значительного снижения ПЭМ в сентябре начало проведения вакцинации в конце сентября с умеренным начальным темпом (2 млн — 2,3 млн — 2,3 млн) и максимально возможным суммарным объемом 2,3 млн не может предотвратить появление второй волны. Вакцинация способствует уменьшению пика ежедневной заболеваемости с 360 тыс. до 220 тыс. человек.

Выводы

Существует высокая вероятность подъема заболеваемости при ослаблении ПЭМ в отсутствие вакцинации населения. При этом высота пика ежедневной заболеваемости зависит от степени снижения ПЭМ и практически не зависит от времени начала ослабления мер.

Значительное снижение ПЭМ одновременно с началом вакцинации не позволяет избежать существенного роста заболеваемости.

Проведение вакцинации на фоне ослабления ПЭМ (по изоляции инфицированных лиц и прерыванию механизма передачи) позволяет снизить заболеваемость, однако степень влияния зависит от времени начала, объема и скорости охвата населения вакцинацией.

Для предотвращения значительного подъема заболеваемости COVID-19 на фоне проводимой вакцинации необходимо поддерживать остальные ПЭМ (по изоляции инфицированных лиц и прерыванию механизма передачи) до достижения объема охвата вакцинацией около 2 млн человек. Оптимальным представляется сохранение вышеуказанных ПЭМ до достижения суммарного охвата вакцинацией 4 млн человек, после чего возможно значительное снижение ПЭМ. При охвате вакцинацией 50% населения Москвы возможна полная отмена ПЭМ.

Заключение

Целью моделирования не было точное предсказание развития эпидемической ситуации в Москве. Наши исследования по прогнозным сценарию

Таблица 2. Результаты моделирования по прогнозным сценариям**Table 2.** Simulation results for forecast scenarios

Сценарии Scenarios	Вакцинация Vaccination	Динамика ежедневной заболеваемости, пик Dynamics of daily morbidity, peak	Кумулятивное количество инфицированных (на 01.02.2021) Cumulative number of infected (as of 01.02.2021)	Кумулятивное количество летальных случаев (на 01.02.2021) Cumulative deaths (as of 01.02.2021)
Сценарий C0 «базовый» (рис. 6) Scenario C0 «Basic» (Fig. 6)	Не проводится No vaccination	Ежедневная заболеваемость — единичные случаи после 01.01.2021 Daily morbidity — isolated cases after 01.01.2021	1 557 718	7789
Сценарий C1.0 (рис. 7) Scenario C1.0 (Fig. 7)	Не проводится No vaccination	Пик второй волны 380 тыс. человек на 530-й день (в середине августа 2021 г.) The peak of the second wave of 380,000 people on day 530 (mid-August 2021)	10 737 123	53 686
Сценарий C1.1 (рис. 8) Scenario C1.1 (Fig. 8)	Проводится Vaccinate	Нет подъема заболеваемости No rise in incidence	1 568 972	7832
Сценарий C1.2 (рис. 8) Scenario C1.2 (Fig. 8)	Проводится Vaccinate	Подъем заболеваемости с пиком 11 387 человек на 662-й день (середина декабря 2021 г.) Rise in incidence with a peak of 11,387 people on day 662 (mid-December 2021)	2 691 315	13 082
Сценарий C2.0 (рис. 7) Scenario C2.0 (Fig. 7)	Не проводится No vaccination	Пик второй волны 65 000 человек на 430-й день (в середине июня 2021 г.) The peak of the second wave of 65,000 people on day 430 (mid-June 2021)	7 678 221	38 391
Сценарий C2.1 (рис. 9) Scenario C2.1 (Fig. 9)	Проводится Vaccinate	Подъем заболеваемости 1120 человек на 378-й день (середина марта 2021 г.) The increase in the incidence of 1120 people on day 378 (mid-March 2021)	1 717 293	8586
Сценарий C2.2 (рис. 9) Scenario C2.2 (Fig. 9)	Проводится Vaccinate	Пик 18 302 случаев на 417-й день (конец апреля 2021 г.) Peak 18,302 cases on day 417 (end of April 2021)	3 610 443	18 052
Сценарий C3.0 (рис. 7) Scenario C3.0 (Fig. 7)	Не проводится No vaccination	Пик 360 тыс. случаев на 310-й день (к 20.01.2021) Peak 360,000 cases on day 310 (20 January 2021)	10 728 363	53 642
Сценарий C3.1 (рис. 10) Scenario C3.1 (Fig. 10)	Проводится Vaccinate	Пик 220 тыс. случаев на 320-й день (к 20.01.2021) Peak 220,000 cases on day 320 (20 January 2021)	8 356 263	41 781

ям имели своей целью поиск возможностей управления эпидемической ситуацией при различных вариантах ее развития. Как показывают результаты вычислительных экспериментов, в настоящее время существует возможность избежать появления так называемой второй волны эпидемии COVID-19 при рациональной стратегии комплекса противоэпидемических мероприятий, включающего вакцинацию

населения. Оптимальным представляется сохранение мер (на достигнутом уровне) по изоляции и прерыванию механизма передачи до достижения суммарного объема охвата вакцинацией 4 млн человек, после чего возможно значительное ослабление противоэпидемических мероприятий. При охвате вакцинацией 50% населения Москвы возможна их полная отмена.

ЛИТЕРАТУРА

1. Боев Б.В. *Прогнозно-аналитические модели эпидемий (оценка последствий техногенных аварий и природных катастроф)*. Лекция. М.; 2005.
2. Wu Z., McGoogan J.M. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72,314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA*. 2020; 323(13): 1239-42. DOI: <http://doi.org/10.1001/jama.2020.2648>
3. Mizumoto K., Kagaya K., Zarebski A., Chowell G. Estimating the asymptomatic proportion of coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases on board the Diamond Princess cruise ship, Yokohama, Japan, 2020. *Euro Surveill*. 2020; 25(10): 2000180. DOI: <http://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2020.25.10.2000180>
4. Pollán M., Pérez-Gómez B., Pastor-Barriuso R., Oteo J., Hernán M.A., Pérez-Olmeda M., et al. Prevalence of SARS-CoV-2 in Spain (ENE-COVID): a nationwide, population-based seroepidemiological study. *Lancet*. 2020; S0140-6736(20)31483-5. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31483-5](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31483-5)
5. Stringhini S., Wisniak A., Piumatti G., Azman A.S., Lauer S.A., Baysson H., et al. Seroprevalence of anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies in Geneva, Switzerland (SEROCoV-POP): a population-based study. *Lancet*. 2020; 396(10247): 313-9. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31304-0](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31304-0)
6. Бароян О.В., Рвачев Л.А., Иванников Ю.Г. *Моделирование и прогнозирование эпидемий гриппа для территории СССР*. М.; 1977.
7. Боев Б.В. Модель развития эпидемии гриппа А(H1N1) в России в сезон 2009–2010 годов. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2010; (1): 52-8.
8. Боев Б.В., Салман Э.Р., Асатрян М.Н. Применение компьютерного инструментария для прогнозирования водных вспышек гепатита А техногенного характера с оценкой эффективности мер противодействия. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2010; (3): 57-62.
9. Асатрян М.Н., Салман Э.Р., Киликковский В.В., Киселев К.В., Сипачева Н.Б., Семенов Т.А. Изучение процессов распространения мутантных вариантов «вакцинального бегства» вируса гепатита В среди населения с помощью компьютерной модели эпидемического процесса гепатита В. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2013; (6): 34-8.
10. Салман Э.Р. *Прогнозирование эпидемии ВИЧ-инфекции среди потребителей внутривенных наркотиков*: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. М.; 2005.
11. Салман Э.Р., Асатрян М.Н., Гайдаренко А.Д., Ершов И.Ф., Семенов Т.А. Прогнозная оценка предотвратимой смертности, ассоциированной с хроническим гепатитом С. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2016; (6): 40-7.
12. Linton N.M., Kobayashi T., Yang Y., Hayashi K., Akhmetzhanov A.R., Jung S.M., et al. Incubation period and other epidemiological characteristics of 2019 novel coronavirus infections with right truncation: a statistical analysis of publicly available case data. *J. Clin. Med.* 2020; 9(2): 538. DOI: <http://doi.org/10.3390/jcm9020538>
13. Luo Y., Trevathan E., Qian Z., Li Y., Li J., Xiao W., et al. Asymptomatic SARS-CoV-2 Infection in Household Contacts of a Healthcare Provider, Wuhan, China. *Emerg. Infect. Dis.* 2020; 26(8): 1930-3. DOI: <http://doi.org/10.3201/eid2608.201016>
14. Epidemiology Working Group for NCIP Epidemic Response, Chinese Center for Disease Control and Prevention. The epidemiological characteristics of an outbreak of 2019 novel coronavirus diseases (COVID-19) in China. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2020; 41(2): 145-51. DOI: <http://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2020.02.003> (in Chinese)
15. Meyerowitz-Katz G., Merone L. A systematic review and meta-analysis of published research data on COVID-19 infection-fatality rates. *medRxiv*. 2020. DOI: <http://doi.org/10.1101/2020.05.03.20089854>
16. Акимкин В.Г., Кузин С.Н., Шипулина О.Ю., Яцышина С.Б., Тиванова Е.В., Каленская А.В. и др. Эпидемиологическое значение определения РНК SARS-CoV-2 среди различных групп населения Москвы и Московской области в период эпидемии COVID-19. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(3): 197-201. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-3-1>
17. Беляков В.Д., Яфаев Р.Х. *Эпидемиология*. М.: Медицина; 1989.

REFERENCES

1. Boev B.V. *Predictive and Analytical Models of Epidemics (Assessment of the Consequences of Man-Made Accidents and Natural Disasters)*. Lecture. Moscow; 2005. (in Russian) <https://www.armscontrol.ru/course/lectures05a/bvb050324.pdf>
2. Wu Z., McGoogan J.M. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72,314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA*. 2020; 323(13): 1239-42. DOI: <http://doi.org/10.1001/jama.2020.2648>
3. Mizumoto K., Kagaya K., Zarebski A., Chowell G. Estimating the asymptomatic proportion of coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases on board the Diamond Princess cruise ship, Yokohama, Japan, 2020. *Euro Surveill*. 2020; 25(10): 2000180. DOI: <http://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2020.25.10.2000180>
4. Pollán M., Pérez-Gómez B., Pastor-Barriuso R., Oteo J., Hernán M.A., Pérez-Olmeda M., et al. Prevalence of SARS-CoV-2 in Spain (ENE-COVID): a nationwide, population-based seroepidemiological study. *Lancet*. 2020; S0140-6736(20)31483-5. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31483-5](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31483-5)
5. Stringhini S., Wisniak A., Piumatti G., Azman A.S., Lauer S.A., Baysson H., et al. Seroprevalence of anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies in Geneva, Switzerland (SEROCoV-POP): a population-based study. *Lancet*. 2020; 396(10247): 313-9. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31304-0](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31304-0)
6. Baroyan O.V., Rvachev L.A., Ivannikov Yu.G. *Modeling and Forecasting Influenza Epidemics for the Territory of the USSR [Modelirovanie i prognozirovanie epidemiy grippa dlya territorii SSSR]*. Moscow; 1977. (in Russian)
7. Boev B.V. Modeling of the epidemic of influenza A(H1N1) in Russia season 2009–2010. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2010; (1): 52-8. (in Russian)
8. Boev B.V., Salman E.R., Asatryan M.N. Application of computer tools for the prediction of water outbreaks of hepatitis A man-made with assessing the effectiveness of counteraction. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2010; (3): 57-62. (in Russian)
9. Asatryan M.N., Salman E.R., Kilikovskiy V.V., Kiselev K.V., Sypacheva N.B., Semenenko T.A. Investigation of the spread of a vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus, by using a computer-based epidemiological model. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy*. 2013; (6): 34-8. (in Russian)
10. Salman E.R. *Forecasting the HIV epidemic among intravenous drug users*: Diss. Moscow; 2005. (in Russian)
11. Salman E.R., Asatryan M.N., Gaydarenko A.D., Ershov I.F., Semenenko T.A. Predictive estimate of preventable mortality associated with chronic hepatitis C. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy*. 2016; (6): 40-7. (in Russian)
12. Linton N.M., Kobayashi T., Yang Y., Hayashi K., Akhmetzhanov A.R., Jung S.M., et al. Incubation period and other epidemiological characteristics of 2019 novel coronavirus infections with right truncation: a statistical analysis of publicly available case data. *J. Clin. Med.* 2020; 9(2): 538. DOI: <http://doi.org/10.3390/jcm9020538>

13. Luo Y., Trevathan E., Qian Z., Li Y., Li J., Xiao W., et al. Asymptomatic SARS-CoV-2 Infection in Household Contacts of a Healthcare Provider, Wuhan, China. *Emerg. Infect. Dis.* 2020; 26(8): 1930-3. DOI: <http://doi.org/10.3201/eid2608.201016>
14. Epidemiology Working Group for NCIP Epidemic Response, Chinese Center for Disease Control and Prevention. The epidemiological characteristics of an outbreak of 2019 novel coronavirus diseases (COVID-19) in China. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 2020; 41(2): 145-51. DOI: <http://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2020.02.003> (in Chinese)
15. Meyerowitz-Katz G., Merone L. A systematic review and meta-analysis of published research data on COVID-19 infection-fatality rates. *medRxiv.* 2020. DOI: <http://doi.org/10.1101/2020.05.03.20089854>
16. Akimkin V.G., Kuzin S.N., Shipulina O.Yu., Yatsyshina S.B., Tivanova E.V., Kalenskaya A.V., et al. Epidemiological significance of detection of SARS-CoV-2 RNA among different groups of population of Moscow and Moscow Region during the COVID-19 outbreak. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2020; 97(3): 197-201. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-3-1> (in Russian)
17. Belyakov V.D., Yafaev R.Kh. *Epidemiology [Epidemiologiya]*. Moscow: Meditsina; 1989. (in Russian)

Информация об авторах:

Асатрян Марина Норайровна — к.м.н., с.н.с. отд. эпидемиологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», 123098, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6273-8615>.
E-mail: masatryan@gamaleya.org

Герасимук Элита Русиндапутри — к.м.н., доц., ГУ «Дубна», 141982, Дубна, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7364-163X>.

Логунов Денис Юрьевич — д.б.н., член-корр. РАН, зам. директора по научной работе ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», 123098, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4035-6581>.

Семененко Татьяна Анатольевна — д.м.н., проф., акад. РАЕН, рук. отдела эпидемиологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», 123098, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6686-9011>.

Гинцбург Александр Леонидович — д.б.н., проф., акад. РАН, директор ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», 123098, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>.

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

Information about the authors:

Marina N. Asatryan — PhD (Med.), senior researcher, Department of Epidemiology, N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology, 123098, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6273-8615>.
E-mail: masatryan@gamaleya.org

Elita R. Gerasimuk — PhD (Med.), Assoc. Prof., Dubna State University, 141982, Dubna, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7364-163X>.

Denis Yu. Logunov — D. Sci. (Biol.), Corresponding Member of RAS, Deputy Director for research, N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology, 123098, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4035-6581>.

Tatyana A. Semenenko — D. Sci. (Med.), Prof., Full Member of RANS, Head, Department of Epidemiology, N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology, 123098, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6686-9011>.

Aleksander L. Gintsburg — D. Sci. (Biol.), Prof., Full Member of RAS, Director, N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology, 123098, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>.

Contribution: the authors contributed equally to this article.

ORIGINAL RESEARCHES

© Asatryan M.N., Gerasimuk E.R., Logunov D.Yu., Semenenko T.A., Gintsburg A.L., 2020



Predicting the dynamics of Covid-19 incidence and planning preventive vaccination measures for Moscow population based on mathematical modeling

Marina N. Asatryan¹✉, Elita R. Gerasimuk², Denis Yu. Logunov¹,
Tatyana A. Semenenko¹, Aleksander L. Gintsburg¹

¹N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology, 123098, Moscow, Russia;

²Dubna State University, 141982, Dubna, Russia

The results of the predictive analytical studies on Covid-19 incidence dynamics in Moscow, taking into account different changes in epidemic prevention measures, including vaccination coverage of the population, are presented.

Research Objective. Using the new epidemiological model for analysis and prediction of the Covid-19 incidence dynamics in Moscow and outlining main strategies in implementing epidemic prevention measures (EPMs), including vaccination in 2020/2021.

Materials and methods. The epidemiological model is based on the Russian approach to mathematical modeling of epidemics, known as Epidynamics. The medium-term forecasting incorporated probable scenarios of epidemic development with different EPMs (isolation of the infected and contacts, breaking the transmission chains), including different rates of vaccination coverage in Moscow.

Results and discussion. The computational simulations demonstrated that the incidence rate is likely to increase with scaling down EPMs and zero vaccination coverage. At the same time, the daily incidence rate depends on the degree of EPMs reduction and basically does not depend on the time when the reduction begins. With scaled-down EPMs, vaccination can decrease the incidence, though its effectiveness will depend on the time of its commencement, coverage and rate.

Conclusion. The computational simulations showed that the vaccination will be efficient for prevention of new surges in COVID-19 cases only if the other EPMs (isolation of the infected and contacts, breaking the transmission chains) are still in place until the vaccination coverage reaches about 2 million people. Ideally, the measures aimed at isolation and breaking of transmission chains should be continued until the total vaccination coverage reaches 4 million people, after which the restrictive measures can be scaled down significantly. With vaccination coverage of 50% of the population of Moscow, the restrictive measures can be completely discontinued.

Keywords: Covid-19, SARS-CoV-2, epidemic process, epidemiological model, potential scenarios, epidemic prevention measures, predictive analytical studies.

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: Asatryan M.N., Gerasimuk E.R., Logunov D.Yu., Semenenko T.A., Gintsburg A.L. [Predicting the dynamics of Covid-19 incidence and planning preventive vaccination measures for Moscow population based on mathematical modeling]. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(4): 289–300.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-1>

Received 6 August 2020

Accepted 17 August 2020

Прогнозирование динамики заболеваемости COVID-19 и планирование мероприятий по вакцинопрофилактике населения Москвы на основе математического моделирования

Асатрян М.Н.¹✉, Герасимук Э.Р.², Логунов Д.Ю.¹, Семенов Т.А.¹, Гинцбург А.Л.¹

¹ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи», 123098, Москва, Россия;

²Государственный университет «Дубна», 141982, Дубна, Россия

Введение. Распространение вируса SARS-CoV-2 продолжается во всем мире. Большие надежды возлагаются на вакцины, которые разрабатываются во многих ведущих научных центрах мира, в том числе в России.

Цель исследования — с помощью разработанной эпидемиологической модели провести анализ и прогноз динамики заболеваемости COVID-19 на территории Москвы и определить основные подходы к организации противоэпидемических мероприятий (ПЭМ) с учетом вакцинации населения на сезон 2020/2021 гг.

Материалы и методы. Эпидемиологическая модель разработана на базе отечественной теории математического моделирования эпидемий «Эпиддинамика». Прогнозную оценку на среднесрочный период проводили на основе прогнозных сценариев развития эпидемической ситуации при различных изменениях ПЭМ (по изоляции инфицированных и контактных лиц, прерыванию механизма передачи), в том числе с учетом различных объемов вакцинации населения Москвы.

Результаты и обсуждение. Вычислительные эксперименты показали, что существует вероятность подъема заболеваемости при ослаблении ПЭМ в отсутствие вакцинации населения. При этом высота пика ежедневной заболеваемости зависит от степени снижения ПЭМ и практически не зависит от времени начала их снижения. Проведение вакцинации на фоне ослабления ПЭМ позволяет снизить заболеваемость, однако степень влияния зависит от времени начала, объема и скорости охвата населения вакцинацией.

Заключение. Результаты вычислительных экспериментов показали, что для предотвращения значительного подъема заболеваемости COVID-19 на фоне проводимой вакцинации необходимо поддерживать остальные ПЭМ до достижения объема охвата вакцинацией около 2 млн человек. Оптимальным представляется сохранение мер по изоляции и прерыванию механизма передачи до достижения суммарного объема охвата вакцинацией 4 млн человек, после которого возможно значительное ослабление ограничительных мер; при охвате вакцинацией 50% населения Москвы возможна их полная отмена.

Ключевые слова: COVID-19; SARS-CoV-2; эпидемический процесс; эпидемиологическая модель; прогнозные сценарии; противоэпидемические мероприятия; прогнозно-аналитические исследования.

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: Асатрян М.Н., Герасимук Э.Р., Логунов Д.Ю., Семенов Т.А., Гинцбург А.Л. Прогнозирование динамики заболеваемости COVID-19 и планирование мероприятий по вакцинопрофилактике населения Москвы на основе математического моделирования. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(4): 289–300.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-1>

Поступила 06.08.2020

Принята в печать 17.08.2020

Dedicated to the memory of Boris Vasilievich Boev

Rationale

The problem of the emergence of epidemics and pandemics of infectious diseases and the search for preventive measures will never lose their relevance. The head of the Laboratory of Epidemiological Cybernetics at the Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, D. Eng. Sci. B.V. Boev wrote in 2005: "According to forecasts, in the first half of this century, anywhere in the world, one should expect an epidemic or an outbreak of both "new" and "old" infectious diseases. In this context, advanced scientific studies on the analysis and forecasting of probable scenarios for development of epidemics of dangerous infectious diseases that may occur as a result of natural and man-made emergencies are of particular importance" [1].

After an outbreak of pneumonia had been reported in Wuhan in December 2019, the novel coronavirus

quickly spread across all countries and continents. By early August 2020, the number of recorded SARS-CoV-2 cases exceeded 18 million people, with the death toll reaching more than 688 thousand fatalities caused by the coronavirus. In Russia, due to the epidemic prevention measures, we were able to curb the spread of the virus; however, according to official statistics, by the beginning of August 2020, more than 850 thousand of SARS-CoV-2 cases and 14 thousand deaths had been reported in Russia. In the meantime, the true number of people who have been infected with the virus far exceeds the number of reported cases. The proportion of unidentified infected people, according to various studies, can range from 11.6% to 35.8% [2–5].

The SARS-CoV-2 virus continues its global spread. We have great expectations for vaccines that are being developed at leading research centers around

the world, including Russia^{1,2}. The new vaccine against coronavirus developed at the Gamaleya National Center for Epidemiology and Microbiology has successfully passed the clinical trials; its manufacturing is scheduled for September 2020, and then it will be available for vaccination of the population.

The use of an appropriate epidemiological model makes it possible to "recover" data on the incidence, and, by using them, to perform computational simulations of various scenarios of the epidemic situation. It seems relevant to conduct predicative and analytical studies based on the mathematical model of the spread of SARS-CoV-2 and to select the most reasonable scenarios of epidemic prevention measures (EPMs), including vaccination of the population (through the example of Moscow).

Materials and methods

The new epidemiological model incorporated data from the published studies on clinical features, pathogenesis and epidemiology of Covid-19, statistical data on the reported Covid-19 cases and deaths in Moscow over the observation period³ as well as census data on the population of Moscow (12.678 million people)⁴.

The new deterministic mathematical model is based on the Epidynamics approach incorporating patterns of infection process development (among individuals) to get an insight into the dynamics of the epidemic process in the population [6]. The Epidynamics approach was successfully used in mathematical modeling and analysis of the spread of significant infectious and non-infectious diseases [7–11]. We used a SEIRF type model as a basis to study the infection dynamics in individuals going through different phases: susceptible (S), exposed (or the incubation period) (E), infected (I), recovered (R) or fatal (F). For modeling, the estimated duration of the phases was as follows: the incubation period after exposure 2–14 days, the clinical (infectious) stage 7–14 days [12].

The probability of an individual's moving to the next stage is set by the functions: $\gamma(\tau)$ is the function of the incubation period; $\delta(\tau)$ is the function of infec-

tion development. The mathematical model of epidemic development is presented as a system of nonlinear integro-differential equations in partial derivatives with initial and boundary conditions [1]. The model has been successfully verified with statistical data on morbidity (with consideration of "recovered" data, ref. to section 1). The model disregards seasonal variations in the virus virulence. In addition, it was assumed that the virus did not significantly mutate during the 2020/2021 season. The potential scenarios were developed with consideration for a new vaccine and 70% immunological efficacy.

The research was carried out in several stages:

1. Recovery of data on the Covid-19 incidence and selection of the baseline scenario;
2. Predictive and analytical studies, including:
 - 2.1. Analysis and prediction of the current epidemic situation (according to the baseline scenario);
 - 2.2. Computational simulations based on the potential scenarios.

At the final stage, the obtained results were interpreted and conclusions were made.

Results and discussion

Recovery of incidence data and selection of a baseline scenario

The existence of asymptomatic and mildly symptomatic cases being a distinctive feature of the novel coronavirus infection contributes to the transmission of infection in the population [13]. While severe and moderately severe cases are recorded in clinics and hospitals, patients with mild or absent symptoms may not seek help. Prior to the large-scale sero-epidemiological studies, only a small proportion of asymptomatic cases was identified through epidemiological contact tracing [14]. Thus, the number of reported cases is only a tip of the iceberg, and the complete picture is required for correct interpretation of the epidemic situation. Therefore, the first stage of our research was focused on computations and recovery of the source data.

The data on Covid-19 incidence among the population of Moscow were recovered by two parameters, which were compared later:

- 1) by estimating upper and lower bounds in mortality from Covid-19 (Infection-Fatality Rate),
- 2) by estimating the immune stratum of the Moscow population through the analysis of the representative sample.

The infection-fatality rate (IFR) was estimated through the systematic review of the reference literature and the meta-analysis of research results obtained by G. Meyerowitz-Katz and L. Merone [15]. Unlike the CFR (the case fatality rate), which is the ratio between the number of deaths and the number of reported (detected) cases, IFR is calculated as the ratio between the number of deaths from infection and the number of all

¹ Official website of the Ministry of Health, COVID-19 in Russia. URL: <https://covid19.rosminzdrav.ru> (reference date 20.07.2020).
URL: <https://covid19.rosminzdrav.ru/mihail-murashko-17-vakczin-protiv-koronavirusa-pokazali-sebja-kak-perspektivnye/> (reference date 20.07.2020).

² WHO. COVID-19 Strategy Update. 20.05.2020.
URL: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/332159/WHO-2019-nCoV-Framework_Mass_Vaccination-2020.1-rus.pdf (reference date 20.07.2020).

³ Stopkoronavirus.rf. Reports of the Communication Center of the Government of the Russian Federation on the situation with the coronavirus URL: <https://стопкоронавирус.рф/info/ofdoc/reports> (reference date 20.07.2020)

⁴ Federal State Statistics Service. URL: <https://gks.ru> (reference date 20.07.2020).

infected people (including asymptomatic and mildly symptomatic cases of infection). The IFR in European countries averaged 0.64% at a confidence interval (CI) of 0.50–0.78% [15].

The data on mortality in Moscow from the Emergency Operations Center correspond to the number of deaths due to Covid-19⁵. In accordance with international guidelines for the certification and coding of Covid-19 as a cause of death⁶, the source data were recalculated with consideration for the cases when the SARS-CoV-2 virus had a significant impact on the development of fatal complications of the disease^{7,8}.

The calculations based on the data⁹ showed that in April, the number of deaths totaled 850 + 360 = 1,165 cases; in May, the number of deaths was 2,757 + 980 = 3,737 cases. Since the number of deaths in March was several times lower than in April and May (without breakdown by the cause), 24 death cases recorded in the statistical reports of the Emergency Operations Center were taken for calculations. Thus, from the date of official registration to June 1, 2020, the number of deaths totals 4,926 cases.

Based on the number of deaths by June 01, 2020 (4,926 cases), we performed calculations, using the model, to find the ratio between the number of detected cases and the number of "recovered" cases, where the calculated (model) number of deaths by June 1 will be close to 4,926. For the upper bound of the mortality rate (IFR 0.78%), the ratio between the detected (reported cases) and the "recovered" cases is approximately 25% or 1 : 4. For example, by June 1, 2020 the cumulative incidence is 718,687 cases according to the model, and 183,088 cases according to official statistics. For the lower bound of the fatality rate (IFR 0.50%), the ratio between the detected (reported cases) and the model-based "recovered" cases is approximately 16% or 1 : 6. For example, the cumulative incidence by June

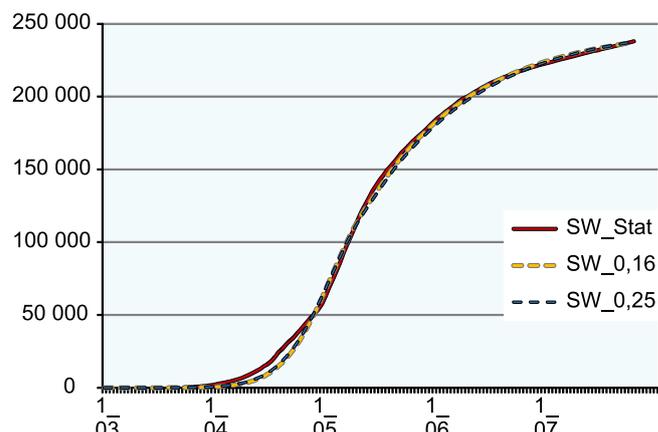


Fig. 1. The result of model verification is a comparison of models (SW_0,16; SW_0,25) and statistical data on cumulative morbidity (detected cases, SW_Stat). Here and in Figs. 2–9: the horizontal axis shows the dates; the vertical axis shows the number of cases.

1, 2020 is 1,134,836 cases according to the model, and 183,088 cases according to official statistics.

The curve of the verified cumulative incidence (detected cases) for two calculation examples (1 : 6 and 1 : 4) matches the curve of official statistics (**Fig. 1**).

The next stage required for well-grounded selection of the baseline scenario from two verified scenarios included the analysis of the antibody test results obtained during the randomized sample studies, which were performed in Moscow from May 15 to May 23, 2020. According to official sources and press service of the Moscow government, SARS-CoV-2 neutralizing antibodies were found in 12.5% of the city's population¹⁰ [16].

Taking into account the specificity and sensitivity of the test systems, the proportion of the infected population was estimated. For this purpose, the possible false-positive cases amounting to 3.8% were subtracted from the declared portion of 12.5%, and then, the false-negative cases amounting to 0.2% were added, representing 8.9% of Moscow population, or 1,130 thousand people¹¹. This estimate is close to the calculated ratio between the detected cases and "recovered" cases, which is 1 : 6 (at 0.50% IFR).

Thus, for further studies, the scenario with the mortality rate of 0.50% was chosen as the baseline or C0 scenario. **Figures 2 and 3** show the graphs of the model and statistical data on the recorded daily and cumulative incidence.

Based on the calculations, the ratio between the detected cases and the "recovered" cases was 1 : 6.

⁵ Official website of the Ministry of Health, COVID-19 in Russia. URL: <https://covid19.rosminzdrav.ru>

URL: https://static-1.rosminzdrav.ru/system/attachments/attachments/000/050/527/original/27052020_MR_STAT_1.pdf (reference date 20.07.2020).

⁶ WHO. COVID-19 - GUIDELINES FOR DEATH CERTIFICATION AND CODING. 20.04.2020.

URL: https://www.who.int/classifications/icd/Guidelines_Cause_of_Death_COVID-19-20200420-RU.pdf?ua=1 (reference date 20.07.2020).

⁷ Official website of the Ministry of Health, COVID-19 in Russia. URL: <https://covid19.rosminzdrav.ru>.

URL: <https://mosgorzdrav.ru/professional/covid-19> (reference date 20.07.2020).

⁸ WHO. Media briefing on #COVID19 with @DrTedros. 10.06.2020.

URL: <https://twitter.com/WHO/status/1270739116078981120> (reference date 20.07.2020).

⁹ Natural movement of the population in the context of the constituent entities of the Russian Federation in January-May 2020.

URL: <https://rosstat.gov.ru/storage/mediabank/yjmHZnUV/edn05-2020.htm> (reference date 20.07.2020).

¹⁰ Official portal of the Mayor and the Government of Moscow. Immunity to coronavirus is formed in 12.5%.

URL: <https://www.mos.ru/news/item/74512073/> (reference date 20.07.2020).

¹¹ SARS-CoV-2 IgM. URL: <https://keul.de/wp-content/uploads/2020/04/IFU-SARS-CoV-2-IgM-CLIA-1.0.pdf> (reference date 20.07.2020).

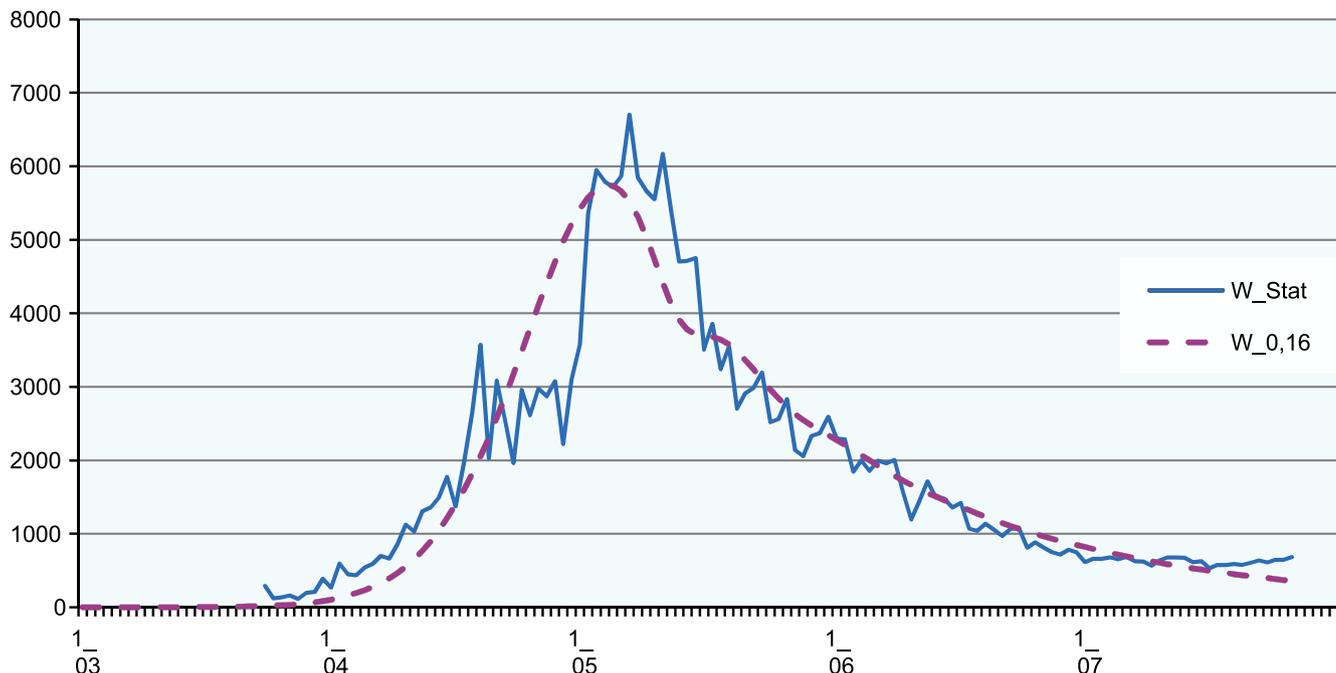


Fig. 2. Detected (reported) cases of daily incidence.
 Statistical data — W_Stat, model — W_0,16.

Figure 4 shows the modeling of the dynamics of the "recovered" cumulative incidence and the graph of the detected (reported) cases for reference. The further studies were based on the "recovered" data for the baseline scenario C0.

Predictive and analytical studies

Analysis and prediction of the current epidemic situation according to the baseline scenario (scenario 1 : 6)

The use of a mathematical model allows us to play out (by using the computer) various scenarios of epidemic development, making it possible to answer two questions: "What will happen if..." and "what would happen if...". The last question is also useful, as it helps evaluate the measures taken by the healthcare system and compare the current situation with a hypothetically probable scenario for the epidemic development without the implemented measures.

Figure 5 shows the graphs of daily incidence without preventive measures (red line) and with the implemented EPMs. As can be seen in Fig. 5, the timely implemented measures for isolation of the infected (including self-isolation of the population) and social distancing significantly reduced the daily incidence (approximately by 25 times) and saved thousands of lives.

The analysis of the model parameters showed that for the baseline C0 scenario, EPMs implemented by June 12, 2020 resulted in the following: the isolation reached 67% (the proportion of all infected (contagious) people); measures aimed at breaking the chains of transmission (hygienic precautions at all socially significant facilities, social distancing, wearing face masks

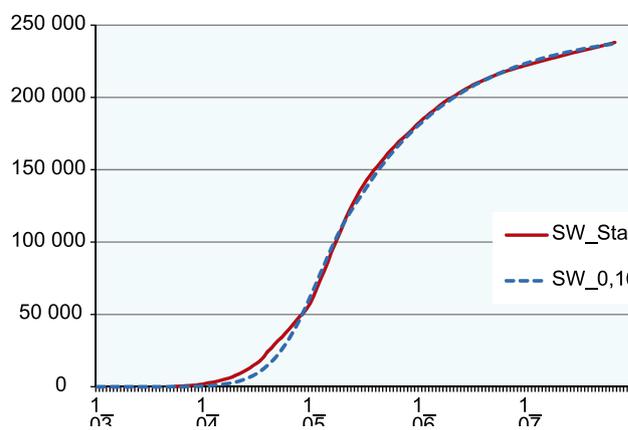


Fig. 3. Detected (reported) cases of cumulative incidence.
 Statistical data — SW_Stat, model — SW_0,16.

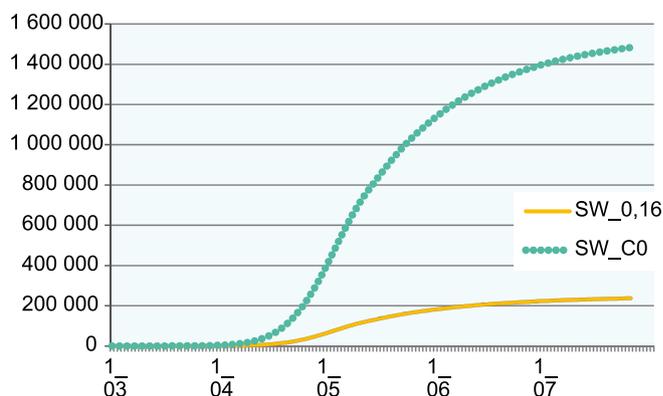


Fig. 4. Detected (reported cases) (SW_0,16) and «recovered» cumulative incidence in accordance with the selected baseline scenario C0 (SW_C0).

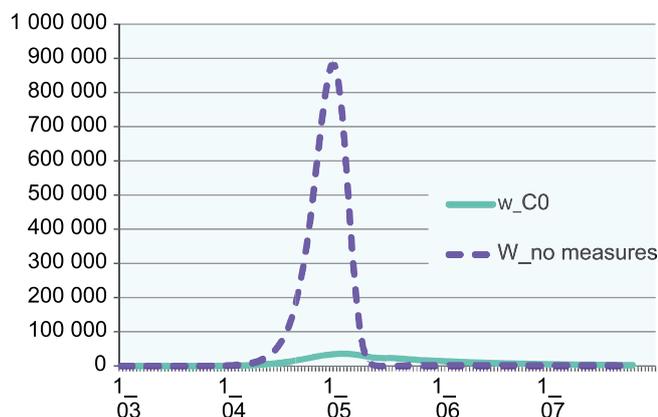


Fig. 5. Comparison of the current daily morbidity (W_C0) and the hypothetical (without measures, W_no measures).

and gloves, personal hygiene) reduced the probability of virus transmission to 14% of its maximum value (the probability of transmission before adoption of the restrictive measures). Taking into account the elimination of restrictions (while retaining social distancing and mask wearing) and expecting an increase in business activity in September, we assumed a slight (and gradual) EPM reduction from June 12 to September 25, 2020^{12,13}. The date of September 25, 2020 is selected randomly as the probable commencement of vaccination among the population of Moscow¹⁴. Provided that the level achieved by September 25, 2020 due to the prevention measures remains stable in the future, the daily incidence will decrease, comprising singular cases after January 2021 (**Fig. 6**). The cumulative number of the infected can total 1.558 million, and the cumulative number of deaths will not exceed 8 thousand according to this scenario.

The C0 scenario shows that if the adopted EPMs remain effective for a long time, the incidence can stay at a fairly low level. But what will happen if measures are scaled down when the incidence rate is low? To answer this question, we performed computational simulations under the scenarios presented below.

Computational simulations under potential scenarios

To reduce and prevent the spread of infection, the main EPMs should be aimed at 3 factors (drivers) of

the epidemic process: The source of infection (isolation of contagious patients), transmission of infection (breaking the chain of infection through different measures, including hygiene preventive measures in public spaces and social facilities, social distancing, wearing face masks and gloves, improved personal hygiene), and susceptible individuals (routine vaccination, emergency preventive care)¹⁵ [17]. Before the new vaccine was developed, the main measures were focused on two factors — source of infection and transmission chains. The model shows that timely adopted restrictive measures helped significantly reduce the disease incidence (Figure 5).

The successful clinical trials of the new Russian vaccine with participation of volunteers add confidence in planning of the measures including vaccination of the population. Can EPMs be scaled down? What coverage and rate of vaccination are required? Under what conditions can the measures be reduced without causing a surge in Covid-19 cases? To answer these questions, we prepared potential scenarios of development of the Covid-19 epidemic situation, taking into account different changes in EPMs and various ranges of vaccination coverage of the Moscow population (the vaccination commencement on September 25, 2020). In addition, we conducted computational simulations with the model (**Table 1**).

The EPM reduction levels are shown in the table as slight, moderate and significant, in percentage terms:

- Slight (insignificant) reduction in measures — reduction by 2% from the level achieved by June 12, 2020;
- Moderate reduction in measures — reduction by 13% from the level achieved by September 25, 2020;
- Significant reduction in measures — reduction by 50% from the level achieved by September 25, 2020.

Potential scenarios with different levels of reduction in EPMs without vaccination of the population

The modeling results for potential scenarios C1.0, C2.0, and C3.0 (without vaccination) are shown in **Fig. 7**.

Scenario C1.0 illustrates the situation when there are only a few isolated cases of the disease (or no cases may be recorded by the end of February) and seasonal ARVI (acute respiratory viral infection) incidence goes down, the restrictive measures will be eliminated, for example, starting from March 2021, which means a sig-

¹² Methodological Guidelines of 08.05.2020 MR 3.1.0178-20 «Determination of a set of measures, as well as indicators that are the basis for the phased lifting of restrictive measures in the context of the epidemic spread of COVID-19». URL: https://www.rospotrebnadzor.ru/upload/MP_pozhagnoe%20snjatie%20ogranič._08.05.2020.pdf (reference date 20.07.2020).

¹³ Sergey Sobyenin's website. Return to normal life. Educational, theater, cinema and children's entertainment centers. URL: <https://www.sobyenin.ru/otmena-ogranicheniy-obrazovanie-i-detskie-tsentry> (reference date 20.07.2020).

¹⁴ A moderate reduction in measures and vaccination commencement from 25.11. 2020 show similar simulation results.

¹⁵ Methodological Guidelines MR 3.1.0170-20. Epidemiology and Prevention of COVID-19 (read with MR 3.1.0175-20, Amendment No. 1 in MR 3.1.0170-20, Epidemiology and Prevention of COVID-19, approved by Rospotrebnadzor on 30/4/2020). URL: https://www.rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/070/metod_recomend_3.1.0170_20_v_1.pdf (reference date 20.07.2020).

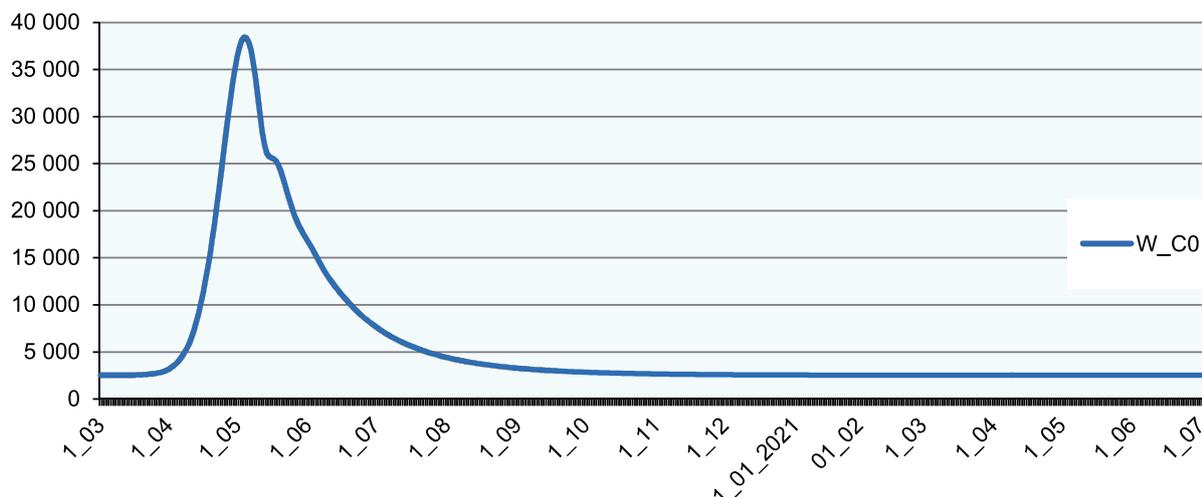


Fig. 6. Dynamics of the daily number of infected cases according to the C0 baseline scenario (W_C0).

nificant reduction in EPMs. Under such conditions and in absence of vaccination, there is a high probability of a new surge in cases and an incidence peak (380,000) reached by mid-August 2021 (Fig. 7, W_C1.0).

Scenario C2.0 illustrates the likelihood of increased incidence (with a peak of 65 thousand in mid-June 2021), when there is a moderate reduction in EPMs, from late September to January 2021, and no vaccination (Fig. 7, W_C2.0).

Scenario C3.0 illustrates the likelihood of increased incidence (with a peak of 360 thousand in early January 2021), when there is a significant reduction in EPMs, from late September to January 2021, and no vaccination (Fig. 7, W_C3.0).

Thus, computational simulations have shown that the incidence rates are likely to increase if EPMs are scaled down and the vaccination is not available. At

the same time, the daily incidence peak rates depend on the extent of EPM reduction and do not depend on the time when the reduction starts. The next stage of our research focuses on the vaccination coverage and rate required to prevent a sharp increase in the incidence.

Potential scenarios with different vaccination coverage of the population

Scenario C1.1: The vaccination of the population starts September 25, 2020 and the achieved level of measures is maintained till the beginning of March 2021 when EPMs can be significantly reduced. If the vaccination coverage gradually increases to 2 million people by January 1, 2021 and, then to 4 million people by the beginning of April, reaching the level of 6.5 million by the end of August 2021, the exponential in-

Table 1. Forecast scenarios — options for a complex of anti-epidemic measures

Scenarios	Isolation of infected persons and interruption of the transmission mechanism (hygiene measures at all socially significant facilities, social distancing, wearing masks and gloves, strengthening of personal hygiene)	Vaccination volume and rate* (total volume reached on the date 01.01.21 — 01.04.21 — 21.10.21)
Scenario C0 «Basic» (Fig. 6)	A slight decrease in measures from June 12 to September 2020, followed by their maintenance at the achieved level	No vaccination
Scenario C1.0 (Fig. 7)	Significant reduction in measures from March 2021	No vaccination
Scenario C1.1 (Fig. 8)	Significant reduction in measures from March 2021	2M — 4M — 6.5M
Scenario C1.2 (Fig. 8)	Significant reduction in measures from March 2021	300k — 2M — 6.5M
Scenario C2.0 (Fig. 7)	Moderate reduction in measures from September 2020*	No vaccination
Scenario C2.1 (Fig. 9)	Moderate reduction in measures from September 2020*	2M — 4M — 6.35M
Scenario C2.2 (Fig. 9)	Moderate reduction in measures from September 2020*	300k — 2M — 4.3M
Scenario C3.0 (Fig. 7)	Significant reduction in measures from September 2020*	No vaccination
Scenario C3.1 (Fig. 10)	Significant reduction in measures from September 2020*	2M — 2.3M — 2.3M

Note. *The beginning of the change in measures coincides with the beginning of vaccination — 25.09.2020.

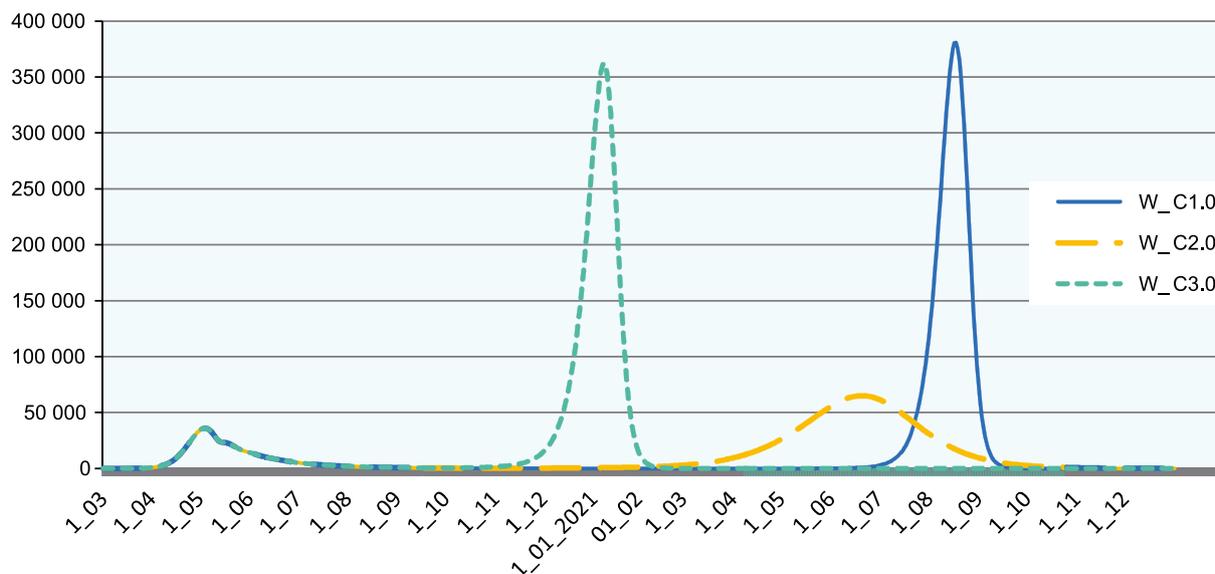


Fig. 7. The modeling of the daily incidence dynamics under scenarios C1.0, C2.0, and C3.0 without vaccination.

crease in the incidence observed with zero vaccination in scenario C1.0 (Fig. 8, W_C1.1) will be prevented.

Scenario C1.2L The isolation measures and the measures aimed at breaking chains of transmission are significantly reduced from March 2021 and the vaccination coverage (from September 25) is scaled down to 300 thousand people by January 1, 2021 and to 2 million people by early April 2021, totaling 6.5 million people vaccinated by mid-October 2021. It will not be possible to completely prevent the increase, and there will be a small second wave of Covid-19 with a peak (11,387 cases) in mid-December 2021. (Fig. 8, W_C1.2).

Thus, to prevent a significant increase in the incidence, the vaccination must be conducted together with the other EPMs (isolation and breaking chains of transmission) until the vaccination coverage reaches at least 2 million people. The measures (isolation and breaking

chains of transmission) remaining in effect until a total vaccination coverage of 4 million people is achieved will it possible to prevent the so-called second wave. After 4 million people are vaccinated, EPMs can be reduced significantly. If the vaccination is administered until 50% of the Moscow residents are vaccinated, EPMs can be completely discontinued.

Scenario C2.1: A moderate reduction in EPMs from the end of September to January 2021, and the vaccination (from September 25) covering 2 million people by January 2021, 4 million people by March 2021 and 6.35 million people by October-November 2021 will result in a low incidence until January 2021, followed by a slight surge in cases with a peak (1,120 people) in mid-March (Fig. 9, W_C2.1).

Scenario C2.2: A moderate reduction in EPMs from late September 2020 to January 2021 and the

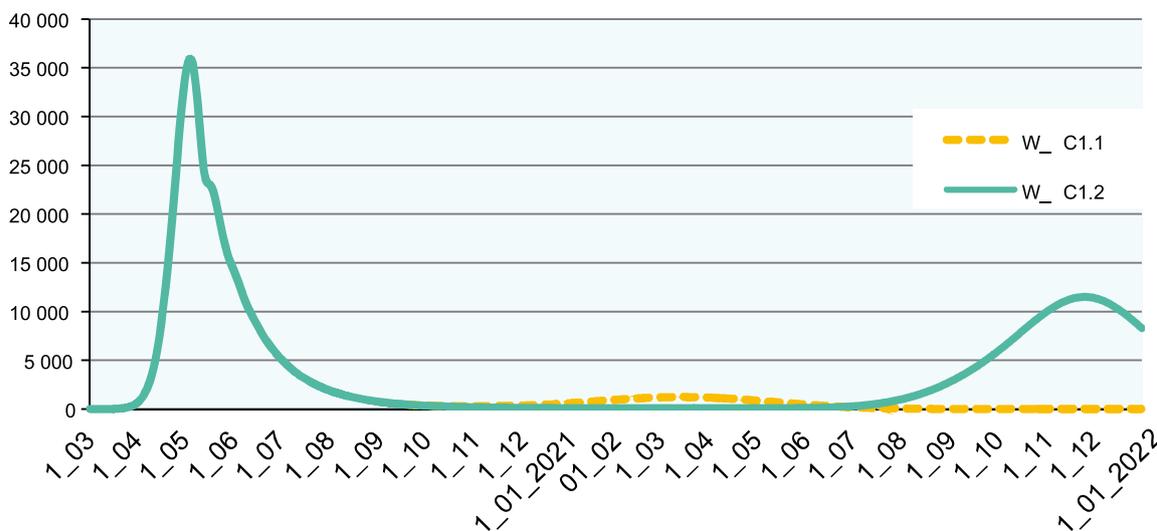


Fig. 8. Comparison between the daily incidence dynamics under the scenario of a significant reduction in measures (isolation and breaking chains of transmission) from March 2021 and different rates of vaccination.

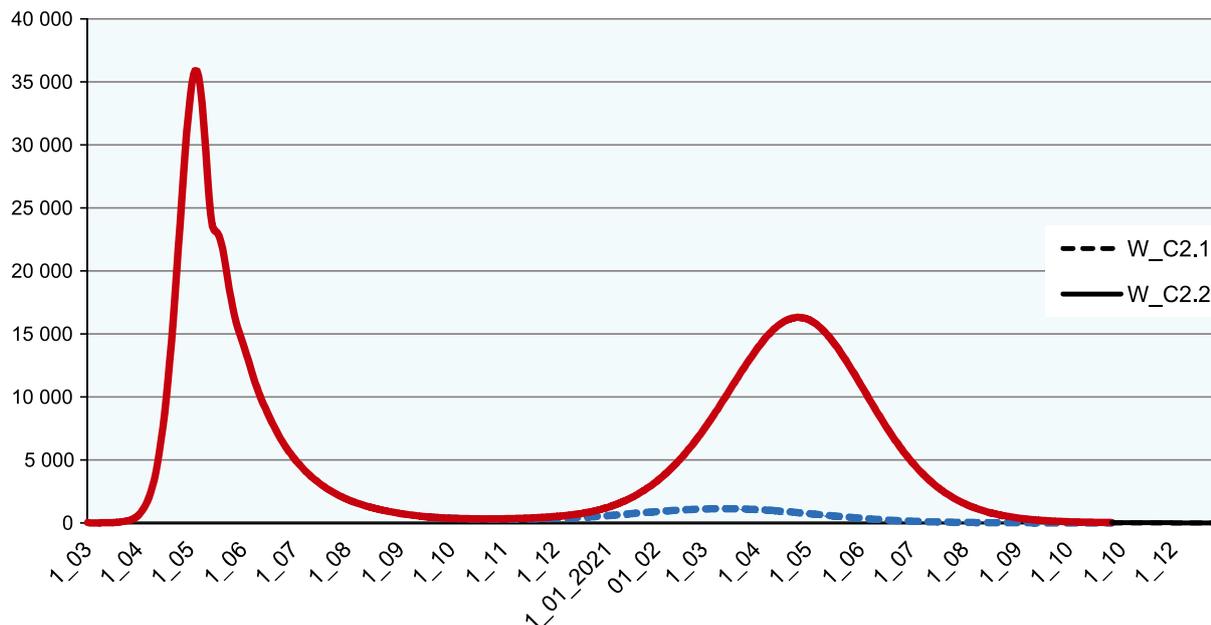


Fig. 9. Comparison between the daily incidence dynamics under the scenario of a moderate reduction in EPMs from the end of September to January 2021 and different rates of vaccination.

vaccination covering 300 thousand people by January 2021, 2 million people by early April and then 4.3 million by October 2021 will lead to a more significant increase in the daily incidence with a peak (18,302 people) at the end of April 2021. (**Fig. 9**, W_C2.2).

The vaccination conducted while EPMs (isolation and breaking the chains of transmission) are moderately reduced can contribute to the decreasing incidence, though its effectiveness depends on the time of its commencement, on its coverage and rate.

Scenario C3.1: A significant reduction in EPMs from the end of September to January 2021 will require a very high rate of vaccination within a short period by

the 300th day (2021) before the incidence begins to rise. The coverage 2 million people reached by 2021 is not sufficient for preventing an exponential increase in the incidence with a peak of the second wave (220,000 people) reached by January 20, 2021. The above coverage helps decrease the incidence rate (from 360 thousand to 220 thousand people) (**Fig. 10**).

Thus, it has been shown that the vaccination accompanied by a significant reduction in EPMs will not prevent a significant increase in the incidence.

The summarized results of computational simulations under the potential scenarios are presented in **Table 2**.

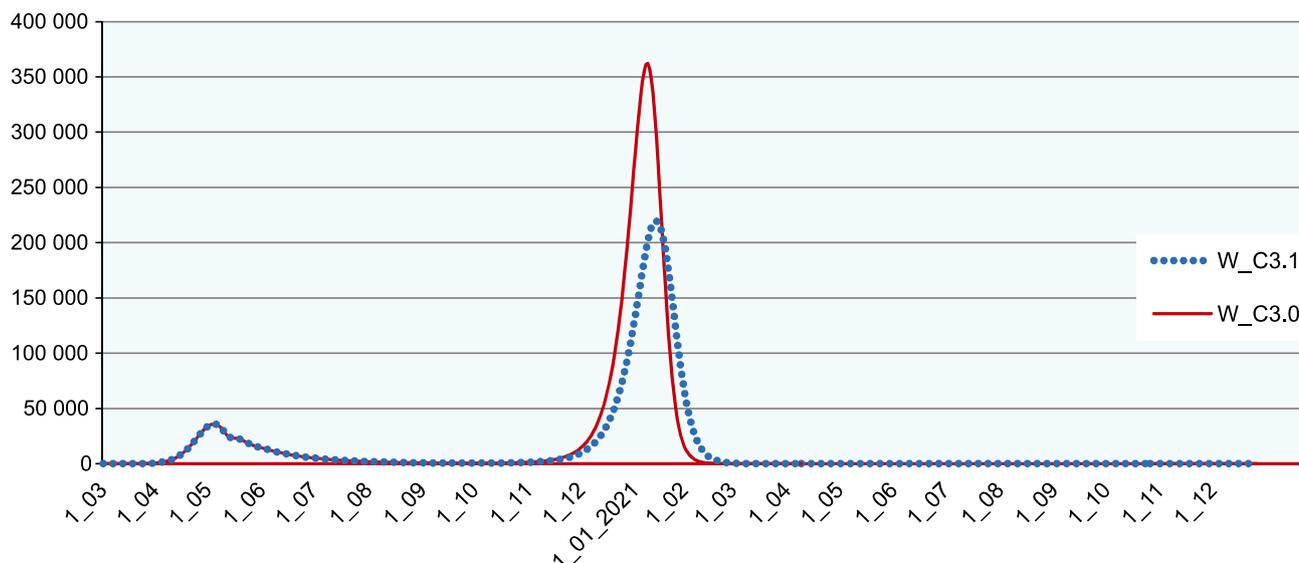


Fig. 10. Comparison between the daily incidence dynamics under the scenario of a significant reduction in EPMs from late September to January 2021 without vaccination (W_C3.0) and with vaccination (W_C3.1).

Table 2. Simulation results for forecast scenarios

Scenarios	Vaccination	Dynamics of daily morbidity, peak	Cumulative number of infected (as of 01.02.2021)	Cumulative deaths (as of 01.02.2021)
Scenario C0 «Basic» (Fig. 6)	No vaccination	Daily morbidity — isolated cases after 01.01.2021	1 557 718	7789
Scenario C1.0 (Fig. 7)	No vaccination	The peak of the second wave of 380,000 people on day 530 (mid-August 2021)	10 737 123	53 686
Scenario C1.1 (Fig. 8)	Vaccinate	No rise in incidence	1 568 972	7832
Scenario C1.2 (Fig. 8)	Vaccinate	Rise in incidence with a peak of 11,317 people on day 662 (mid-December 2021)	2 691 315	13 082
Scenario C2.0 (Fig. 7)	No vaccination	The peak of the second wave of 65,000 people on day 430 (mid-June 2021)	7 678 221	38 391
Scenario C2.1 (Fig. 9)	Vaccinate	The increase in the incidence of 1120 people on day 378 (mid-March 2021)	1 717 293	8586
Scenario C2.2 (Fig. 9)	Vaccinate	Peak 18,302 cases on day 417 (end of April 2021)	3 610 443	18 052
Scenario C3.0 (Fig. 7)	No vaccination	Peak 360,000 cases on day 310 (20 January 2021)	10 728 363	53 642
Scenario C3.1 (Fig. 10)	Vaccinate	Peak 220,000 cases on day 320 (20 January 2021)	8 356 263	41 781

When comparing scenarios C0 and C1.0, the computational simulations illustrated a situation when the epidemic was already on the decline, but a significant reduction in EPMs (starting from March 2021) and the absence of vaccination can result in a high probability of a significant increase in the incidence (with a peak of 380,000 in mid-August 2021).

When comparing scenarios C1.0 and C1.1, the computational simulations showed that the vaccination (from the end of September) covering 4 million people before EPMs are significantly reduced prevents the occurrence of a second wave of the disease.

When comparing scenarios C1.0 and C1.2, the computational simulations showed that, while the incidence is low, the vaccination (from the end of September) starting from 300 thousand people, then reaching 2 million people and, finally, covering the total of 6.5 million people, does not completely prevent the increase in the daily incidence (with a peak of 11,317 cases in mid-December 2021).

When comparing scenarios C0 and C2.0, the computational simulations showed that the moderate reduction in EPMs in September 2020 and the absence of vaccination will result in low incidence rates until mid-November 2020 to be followed by an increase in the incidence with a peak (65,300) in mid-June 2021.

When comparing scenarios C2.0 and C2.1, the computational simulations showed that the moderate reduction in EPMs in September 2020, the vaccination

(from the end of September 2020), the total coverage of 6.35 million people and the moderate rate of vaccination (2 mln — 4 mln — 6.35 mln) will help prevent the second wave of the disease (at the end of April 2021). There is a slight increase in the incidence (11,20 cases) in mid-March 2021.

When comparing scenarios C2.0 and C2.2, the computational simulations showed that the moderate reduction in EPMs, the vaccination (from the end of September 2020), the total coverage of 4.3 million people and the lower rate of vaccination (300 thousand — 2 million — 4.3 million) will help decrease the incidence. There is a slight increase in the incidence (18,302 cases) with a peak at the end of April 2021.

When comparing scenarios C0 and C3.0, the computational simulations showed that the significant reduction in EPMs in September 2020 and the absence of vaccination will result in a low incidence until November 1, 2020 to be followed by an exponential increase in the daily incidence (360,000 cases) with a peak in early January 2021.

When comparing scenarios C3_0 and C3_1, the computational simulations showed that the significant reduction in EPMs in September, the vaccination (from the end of September) at a moderate rate (2 million — 2.3 million — 2.3 million) and the maximum possible total coverage of 2.3 million people cannot prevent the occurrence of a second wave. The vaccination helps decrease the daily incidence rates from 360,000 to 220,000.

Implications

1. There is a high probability of an increase in the incidence if EPMs are reduced and the vaccination is absent. However, daily incidence rates depend on the extent of reduction in EPMs, hardly depending on the time when the reduction takes place.

2. The commencement of vaccination accompanied by a significant reduction in EPMs does not prevent a significant increase in the incidence;

3. The vaccination accompanied by a reduction in EPMs (isolation and breaking chains of transmission) can decrease the incidence, but the impact depends on the time of its commencement, its coverage and rate.

4. To prevent a significant increase in the Covid-19 incidence during the vaccination, the other EPMs (isolation of the infected and breaking chains of transmission) must be maintained until the vaccination coverage reaches approximately 2 million people. Ideally, EPMs should remain effective until the total vaccination coverage of 4 million people is reached' then, EPMs can be significantly reduced. When the vaccination coverage reaches 50% of the Moscow population, EPMs can be completely discontinued.

Conclusion

The modeling was not intended for making an accurate prediction of development of the epidemic situation in Moscow. Our research by using scenarios was aimed at finding opportunities for managing the epidemic situation in different versions of its development. The computational simulations show that the appropriate strategy in EPMs and vaccination will prevent the so-called second wave of Covid-19 epidemic. The optimum solution is to keep maintaining EPMs until a total vaccination coverage of 4 million people is reached, after which EPMs can be significantly reduced. When the vaccination coverage reaches 50% of the Moscow population, EPMs can be completely discontinued.

REFERENCES

1. Boev B.V. *Predictive and Analytical Models of Epidemics (Assessment of the Consequences of Man-Made Accidents and Natural Disasters)*. Lecture. Moscow; 2005. (in Russian) <https://www.armscontrol.ru/course/lectures05a/bvb050324.pdf>
2. Wu Z., McGoogan J.M. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72,314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA*. 2020; 323(13): 1239-42. DOI: <http://doi.org/10.1001/jama.2020.2648>
3. Mizumoto K., Kagaya K., Zarebski A., Chowell G. Estimating the asymptomatic proportion of coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases on board the Diamond Princess cruise ship, Yokohama, Japan, 2020. *Euro Surveill*. 2020; 25(10): 2000180. DOI: <http://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2020.25.10.2000180>
4. Pollán M., Pérez-Gómez B., Pastor-Barriuso R., Oteo J., Hernán M.A., Pérez-Olmeda M., et al. Prevalence of SARS-CoV-2 in Spain (ENE-COVID): a nationwide, population-based seroepidemiological study. *Lancet*. 2020; S0140-6736(20)31483-5. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31483-5](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31483-5)
5. Stringhini S., Wisniak A., Piumatti G., Azman A.S., Lauer S.A.,

- Baysson H., et al. Seroprevalence of anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies in Geneva, Switzerland (SEROCoV-POP): a population-based study. *Lancet*. 2020; 396(10247): 313-9. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31304-0](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31304-0)
6. Baroyan O.V., Rvachev L.A., Ivannikov Yu.G. *Modeling and Forecasting Influenza Epidemics for the Territory of the USSR [Modelirovanie i prognozirovanie epidemii grippa dlya territorii SSSR]*. Moscow; 1977. (in Russian)
7. Boev B.V. Modeling of the epidemic of influenza A(H1N1) in Russia season 2009–2010. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2010; (1): 52-8. (in Russian)
8. Boev B.V., Salman E.R., Asatryan M.N. Application of computer tools for the prediction of water outbreaks of hepatitis A man-made with assessing the effectiveness of counteraction. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2010; (3): 57-62. (in Russian)
9. Asatryan M.N., Salman E.R., Kilikovskiy V.V., Kiselev K.V., Sipacheva N.B., Semenenko T.A. Investigation of the spread of a vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus, by using a computer-based epidemiological model. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy*. 2013; (6): 34-8. (in Russian)
10. Salman E.R. *Forecasting the HIV epidemic among intravenous drug users*: Diss. Moscow; 2005. (in Russian)
11. Salman E.R., Asatryan M.N., Gaydarenko A.D., Ershov I.F., Semenenko T.A. Predictive estimate of preventable mortality associated with chronic hepatitis C. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy*. 2016; (6): 40-7. (in Russian)
12. Linton N.M., Kobayashi T., Yang Y., Hayashi K., Akhmetzhanov A.R., Jung S.M., et al. Incubation period and other epidemiological characteristics of 2019 novel coronavirus infections with right truncation: a statistical analysis of publicly available case data. *J. Clin. Med*. 2020; 9(2): 538. DOI: <http://doi.org/10.3390/jcm9020538>
13. Luo Y., Trevathan E., Qian Z., Li Y., Li J., Xiao W., et al. Asymptomatic SARS-CoV-2 Infection in Household Contacts of a Healthcare Provider, Wuhan, China. *Emerg. Infect. Dis*. 2020; 26(8): 1930-3. DOI: <http://doi.org/10.3201/eid2608.201016>
14. Epidemiology Working Group for NCIP Epidemic Response, Chinese Center for Disease Control and Prevention. The epidemiological characteristics of an outbreak of 2019 novel coronavirus diseases (COVID-19) in China. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2020; 41(2): 145-51. DOI: <http://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2020.02.003> (in Chinese)
15. Meyerowitz-Katz G., Merone L. A systematic review and meta-analysis of published research data on COVID-19 infection-fatality rates. *medRxiv*. 2020. DOI: <http://doi.org/10.1101/2020.05.03.20089854>
16. Akimkin V.G., Kuzin S.N., Shipulina O.Yu., Yatsyshina S.B., Tivanova E.V., Kalenskaya A.V., et al. Epidemiological significance of detection of SARS-CoV-2 RNA among different groups of population of Moscow and Moscow Region during the COVID-19 outbreak. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(3): 197-201. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-3-1> (in Russian)
17. Belyakov V.D., Yafaev R.Kh. *Epidemiology [Epidemiologiya]*. Moscow: Meditsina; 1989. (in Russian)

ЛИТЕРАТУРА

1. Боев Б.В. *Прогностно-аналитические модели эпидемий (оценка последствий техногенных аварий и природных катастроф)*. Лекция. М.; 2005.
2. Wu Z., McGoogan J.M. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72,314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA*. 2020; 323(13): 1239-42. DOI: <http://doi.org/10.1001/jama.2020.2648>

3. Mizumoto K., Kagaya K., Zarebski A., Chowell G. Estimating the asymptomatic proportion of coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases on board the Diamond Princess cruise ship, Yokohama, Japan, 2020. *Euro Surveill.* 2020; 25(10): 2000180. DOI: <http://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2020.25.10.2000180>
4. Pollán M., Pérez-Gómez B., Pastor-Barriuso R., Oteo J., Hernán M.A., Pérez-Olmeda M., et al. Prevalence of SARS-CoV-2 in Spain (ENE-COVID): a nationwide, population-based seroepidemiological study. *Lancet.* 2020; S0140-6736(20)31483-5. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31483-5](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31483-5)
5. Stringhini S., Wisniak A., Piumatti G., Azman A.S., Lauer S.A., Baysson H., et al. Seroprevalence of anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies in Geneva, Switzerland (SEROCoV-POP): a population-based study. *Lancet.* 2020; 396(10247): 313-9. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31304-0](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31304-0)
6. Бароян О.В., Рвачев Л.А., Иванников Ю.Г. *Моделирование и прогнозирование эпидемий гриппа для территории СССР.* М.; 1977.
7. Боев Б.В. Модель развития эпидемии гриппа А(H1N1) в России в сезон 2009–2010 годов. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2010; (1): 52-8.
8. Боев Б.В., Салман Э.Р., Асатрян М.Н. Применение компьютерного инструментария для прогнозирования водных вспышек гепатита А техногенного характера с оценкой эффективности мер противодействия. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2010; (3): 57-62.
9. Асатрян М.Н., Салман Э.Р., Кириков В.В., Киселев К.В., Сипачева Н.Б., Семенов Т.А. Изучение процессов распространения мутантных вариантов «вакцинального бегства» вируса гепатита В среди населения с помощью компьютерной модели эпидемического процесса гепатита В. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы.* 2013; (6): 34-8.
10. Салман Э.Р. *Прогнозирование эпидемии ВИЧ-инфекции среди потребителей внутривенных наркотиков:* Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. М.; 2005.
11. Салман Э.Р., Асатрян М.Н., Гайдаренко А.Д., Ершов И.Ф., Семенов Т.А. Прогнозная оценка предотвратимой смертности, ассоциированной с хроническим гепатитом С. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы.* 2016; (6): 40-7.
12. Linton N.M., Kobayashi T., Yang Y., Hayashi K., Akhmetzhanov A.R., Jung S.M., et al. Incubation period and other epidemiological characteristics of 2019 novel coronavirus infections with right truncation: a statistical analysis of publicly available case data. *J. Clin. Med.* 2020; 9(2): 538. DOI: <http://doi.org/10.3390/jcm9020538>
13. Luo Y., Trevathan E., Qian Z., Li Y., Li J., Xiao W., et al. Asymptomatic SARS-CoV-2 Infection in Household Contacts of a Healthcare Provider, Wuhan, China. *Emerg. Infect. Dis.* 2020; 26(8): 1930-3. DOI: <http://doi.org/10.3201/eid2608.201016>
14. Epidemiology Working Group for NCIP Epidemic Response, Chinese Center for Disease Control and Prevention. The epidemiological characteristics of an outbreak of 2019 novel coronavirus diseases (COVID-19) in China. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 2020; 41(2): 145-51. DOI: <http://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2020.02.003> (in Chinese)
15. Meyerowitz-Katz G., Merone L. A systematic review and meta-analysis of published research data on COVID-19 infection-fatality rates. *medRxiv.* 2020. DOI: <http://doi.org/10.1101/2020.05.03.20089854>
16. Акимкин В.Г., Кузин С.Н., Шипулина О.Ю., Яцьшина С.Б., Тиванова Е.В., Каленская А.В. и др. Эпидемиологическое значение определения РНК SARS-CoV-2 среди различных групп населения Москвы и Московской области в период эпидемии COVID-19. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2020; 97(3): 197-201. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-3-1>
17. Беляков В.Д., Яфаев Р.Х. *Эпидемиология.* М.: Медицина; 1989.

Information about the authors:

Marina N. Asatryan[✉] — PhD (Med.), senior researcher, Department of Epidemiology, N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology, 123098, Moscow, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6273-8615>. E-mail: masatryan@gamaleya.org

Elita R. Gerasimuk — PhD (Med.), Assoc. Prof., Dubna State University, 141982, Dubna, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7364-163X>.

Denis Yu. Logunov — D. Sci. (Biol.), Corresponding Member of RAS, Deputy Director for research, N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology, 123098, Moscow, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4035-6581>.

Tatyana A. Semenenko — D. Sci. (Med.), Prof., Full Member of RANS, Head, Department of Epidemiology, N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology, 123098, Moscow, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6686-9011>.

Aleksander L. Gintsburg — D. Sci. (Biol.), Prof., Full Member of RAS, Director, N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology, 123098, Moscow, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>.

Contribution: the authors contributed equally to this article.

Информация об авторах:

Асатрян Марина Норайровна[✉] — к.м.н., с.н.с. отд. эпидемиологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», 123098, Москва, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6273-8615>. E-mail: masatryan@gamaleya.org

Герасимук Элита Русиндапурти — к.м.н., доц., ГУ «Дубна», 141982, Дубна, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7364-163X>.

Логунов Денис Юрьевич — д.б.н., член-корр. РАН, зам. директора по научной работе ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», 123098, Москва, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4035-6581>.

Семенов Татьяна Анатольевна — д.м.н., проф., акад. РАЕН, рук. отдела эпидемиологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», 123098, Москва, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6686-9011>.

Гинцбург Александр Леонидович — д.б.н., проф., акад. РАН, директор ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», 123098, Москва, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>.

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



Характеристика маркеров холодовой адаптации кандидатных вакцинных штаммов для живых аттенуированных вакцин против ветряной оспы и опоясывающего герпеса

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

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

Введение. Значимость ветряной оспы обусловлена ее широкой распространенностью, значительной вероятностью тяжелого клинического течения, осложнений, которые могут приводить к летальным исходам. Вакцинация является единственным специфическим способом профилактики заболевания. **Цель** работы заключалась в оценке аттенуации холодоадаптированных (ХА) кандидатных вирусных штаммов *Varicella zoster* и *Herpes zoster* традиционными и новыми методами.

Материалы и методы. В работе использовали штаммы диплоидных клеток легких и кожно-мышечной ткани эмбриона человека, первичные и диплоидные клетки фибробластов эмбриона морской свинки. Были получены два клинических изолята вируса — от ребенка, больного ветряной оспой, и взрослого в период реактивации опоясывающего герпеса. В качестве контроля использовали вакцинный штамм vOка и лабораторный штамм Ellen. Инфекционную активность вирусов определяли методом предельных разведений вируса в чувствительных культурах. Вирулентность устанавливали при анализе инфицированных вирусом *Varicella zoster* хорион-аллантаисных оболочек развивающихся куриных эмбрионов.

Результаты. Клинические изоляты пассированы при пониженной температуре и исследованы в сравнительных экспериментах на наличие биологических маркеров аттенуации. Установлено, что штаммы вируса *Varicella zoster* vFiraVax и вируса *Herpes zoster* vZelVax обладали температурочувствительностью и холодоадаптируемостью, но не вирулентностью. Аттенуированные ХА вирусные штаммы индуцировали более низкий уровень экспрессии α - и γ -интерфероновых рецепторов на мононуклеарных клетках человека в отличие от их родительских вариантов.

Заключение. Нами созданы и охарактеризованы два кандидатных вакцинных штамма на основе аттенуации клинических изолятов.

Ключевые слова: вирус ветряной оспы; вирус опоясывающего герпеса; живой аттенуированный вирус ветряной оспы и опоясывающего герпеса; температурочувствительность; холодоадаптируемость; клеточный маркер; атт-фенотип; новые биологические маркеры аттенуации.

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., Зверев В.В. Характеристика маркеров холодовой адаптации кандидатных вакцинных штаммов для живых аттенуированных вакцин против ветряной оспы и опоясывающего герпеса. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(4): 202–311.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-2>

Поступила 05.02.2020
Принята в печать 06.04.2020

Characterization of markers of cold-adapted candidate virus strains for live attenuated vaccines against chickenpox and shingles

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

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

Introduction. Chickenpox poses a significant public health concern due to its worldwide occurrence, a substantial probability of severe clinical progression, development of complications that can lead to a fatal outcome. Routine vaccination is the only way to prevent the disease. **The purpose** of this study was to assess the attenuation of cold-adapted (CA) candidate virus strains of *Varicella zoster* and *Herpes zoster* by using traditional and new methods.

Materials and methods. The study was performed on strains of diploid cells from human embryonic lung and musculoskeletal tissue, primary and diploid cells of guinea pig fetal fibroblasts. Two clinical isolates of the virus were obtained — from a child with chickenpox and from an adult during the reactivation of shingles. The vOka vaccine strain and Ellen strain, a laboratory strain, were used as a control. The viral infectivity was measured by using a sensitive limiting dilution assay. The virulence was measured through the analysis of chick embryo chorioallantoic membranes infected with the *Varicella zoster* virus.

Results. The clinical isolates were sub-cultured at lower temperatures, put through comparative tests and checked for presence of attenuation biomarkers. It was found that vFiraVax, a *Varicella zoster* virus strain, and vZelVax, a *Herpes zoster* virus strain were temperature-sensitive and cold-adaptable, but they lacked virulence. Attenuated CA virus strains induced lower expression of IFN- α and IFN- γ receptors on human mononuclear cells as compared to their parental variants.

Conclusion. We created and assessed two candidate vaccine strains through attenuation of clinical isolates.

Keywords: *varicella zoster virus; herpes zoster virus; live attenuated varicella zoster and herpes zoster virus; temperature-sensitive; cold-adapted; cell marker; att-phenotype; new attenuation biomarkers.*

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., Zverev V.V. [Characterization of markers of cold-adapted candidate virus strains for live attenuated vaccines against chickenpox and shingles]. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii.* 2020; 97(4): 303–311. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-2>

Received 5 February 2020

Accepted 6 April 2020

Введение

Вирус *Varicella zoster* (VZV) является человеческим α -герпесвирусом и тесно связан с вирусом герпеса простого 1-го и 2-го типов. VZV имеет типичную морфологию вируса герпеса, однако его геном является самым небольшим среди α -герпесвирусов и он кодирует более 70 генных продуктов [1].

Ветряная оспа (ВО) имеет общую этиологию и тесную патогенетическую связь с хронической формой инфекции — опоясывающим герпесом (ОГ), обусловленным вирусом *Herpes zoster* (HZV). ВО и ОГ являются разными клиническими формами одного инфекционного процесса. Риск развития ОГ у переболевших ВО составляет 10–30%. Среди лиц в возрасте 60–80 лет частота заболевания ОГ варьирует от 5 до 10 случаев на 1000 человек. У 15–40% больных ОГ развивается постгерпетическая невралгия, плохо поддающаяся лечению и приводящая к значительному снижению качества жизни. Другие осложнения реактивации включают энцефалиты, моторную слабость, миелопатию и др. Наиболее тяжелые осложнения возникают у иммунокомпрометированных индивидуумов [2–4].

За рубежом на протяжении многих лет применяется живая культуральная вакцина на основе аттенуированного вирусного штамма vOka (Япония). Эта вакцина создает длительный напряженный поствакцинальный иммунитет после двукратного цикла иммунизации (на 10–20 лет — период наблюдения) и предотвращает смертельные исходы у новорожденных и детей с ослабленным иммунитетом, а также частично предотвращает развитие ОГ у пожилых людей и людей с ослабленным иммунитетом [5].

На основе вакцинного штамма vOka производится вакцина для иммунизации детей и взрослых. Доза вируса VZV в вакцине для взрослых увеличивается на 2 порядка.

Отечественные аналоги вакцины против ВО в России отсутствуют. В нашей лаборатории созданы два отечественных аттенуированных вакцинных штамма VZV для конструирования живых культуральных отечественных вакцин, предназначенных для детей и взрослых.

Основной целью настоящей работы является оценка аттенуированных вакцинных штаммов по традиционным биологическим маркерам аттенуации и поиск новых маркеров аттенуации для более полного контроля свойств кандидатов в вакцинные вирусные штаммы для живой культуральной вакцины против ВО и ОГ.

Материалы и методы

Культуры клеток

В работе использовали штаммы диплоидных клеток легких эмбриона человека (ЛЭЧ-3 и MRC-5), штамм диплоидных клеток кожно-мышечной ткани эмбриона человека (КМ 27), первичные и диплоидные клетки фибробластов эмбрионов морской свинки (ФЭМС).

Диплоидные клеточные культуры выращивали на питательной среде DMEM/F12 («PanEco») с 10 мМ HEPES, 5% эмбриональной телячьей сыворотки («HyClone») с добавлением 2 мМ глутамина и 40 мкг/мл гентамицина.

Вирусы

Получили клинический изолят VZV и клинический изолят HZV от инфицированных пациентов

в виде корочек от везикул, сформировавшихся с начала появления сыпи. Один изолят получили от здоровой девочки 6 лет, заболевшей ВО в Москве, другой — от мужчины 63 лет в период реактивации рецидивирующего ОГ.

Аттенуация клинических изолятов

Вирусный изолят ВО и ОГ аттенуировали на клетках ЛЭЧ-3 при низкой температуре (30°C). Изоляты прошли 12 пассажей на диплоидных клетках ЛЭЧ-3, 6 пассажей на первичных клетках ФЭМС и дополнительно 2 пассажа на клетках ЛЭЧ-3. После завершения полного цикла холодовой адаптации изоляту VZV присвоили название vFiraVax VZV, а изоляту HZV — vZelVax HZV.

В качестве референс-вирусов VZV использовали аттенуированный вакцинный вирусный штамм vOKA/Merck VZV (США) и лабораторный вирусный штамм Ellen VZV (США).

Определение инфекционной активности вирусов VZV

Инфекционную активность вирусов определяли на клеточных культурах КМ-27 или ФЭМС, выращенных на 24-луночных планшетах. В поддерживающей питательной среде ДМЕМ с 2% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) готовили 10-кратные разведения вирусосодержащей жидкости (ВСЖ) с 10^{-1} до 10^{-10} . Из планшетов с выросшими клетками ростовую среду удаляли и монослой клеток однократно промывали фосфатно-буферным раствором (ФБР). По 0,1 мл каждого разведения ВСЖ вносили в центр лунки с клеточным монослоем и оставляли на контакт при 36,5°C и 5% CO₂ на 1 ч. После завершения контакта в каждую лунку, включая лунки с контрольными клетками, вносили по 1 мл поддерживающей среды ДМЕМ с 2% ЭТС. Результаты титрования учитывали на 6–7-е сутки с момента инфицирования в реакции гемадсорбции с 0,25% взвесью эритроцитов морской свинки или человека 0 группы Rh+. За титр вируса принимали максимальное разведение вируса, вызывающее гемадсорбцию в 50% инфицированных культур клеток, при отсутствии гемадсорбции в контрольных неинфицированных культурах клеток.

Заражение хорион-аллантаической оболочки (ХАО) развивающихся куриных эмбрионов

У 11–12-дневных куриных эмбрионов создавали искусственную воздушную полость, на нее наносили по 0,1 мл ВСЖ VZV. Ежедневно просматривали эмбрионы на жизнеспособность. В случае гибели эмбрионов на следующие сутки их уничтожали. Наблюдали за эмбрионами в течение не более 6 сут. После охлаждения инфицированных эмбрионов из них извлекали ХАО на чашку Петри, обо-

лочку отмывали ФБР и просматривали на наличие геморрагии или белых оспин.

Получение мышинных сывороток, специфичных к VZV

Мышей линии BALB/c, свободных от патогенной флоры (SPF-мыши), иммунизировали ВСЖ по 0,5 мл с 6 Ig ГАДЕ_{50/0,1мл} (ГАДЕ — гемадсорбирующая единица) внутривентриально трехкратно 3 дня подряд. Указанный цикл иммунизации повторяли трижды с 2-недельным интервалом.

Определение вирусспецифических антител в непрямом иммуноферментном анализе

В качестве VZV-сорбента на твердую фазу иммунологического 96-луночного планшета («Nunk») сорбировали лизаты клеток КМ 27, инфицированных лабораторным штаммом Ellen VZV. Лизаты инфицированных клеток получали путем заражения монослоя клеток КМ 27, выращенных на культуральных флаконах площадью 175 см² («Costar»). Для инфицирования клеточного монослоя из культурального флакона удаляли ростовую среду, монослой клеток дважды промывали ФБР и на клеточный монослой вносили по 5 мл ВСЖ Ellen VZV с множественностью инфицирования 0,2. Культивирование инфицированных клеток проводили в инкубаторе в течение 10 сут при 36,5°C и 5% CO₂. Затем из культуральных флаконов собирали ВСЖ, а в культуральный флакон с инфицированными клетками вносили по 5 мл ФБР, и культуральный флакон с инфицированными клетками трижды замораживали при –70°C и размораживали при 4°C. В полученном инфицированном лизате, содержащем клеточно-ассоциированный VZV, на аппарате «NanoPhotometer NP80-Touch» определяли концентрацию белка.

После вортексирования инфицированный клеточный лизат сорбировали на лунки 96-луночных планшетов по 50 мкл с концентрацией белка 5 мкг на лунку и высушивали в термостате при 36,5°C в течение 18–20 ч.

Постановку непрямого иммуноферментного анализа осуществляли по общепринятой методике: блокировка открытых связей 1% бычьим сывороточным альбумином на 0,01 М ФБР в термостате в течение 1,5 ч, удаление блокирующего раствора, титрование исследуемой сыворотки морской свинки с двукратным шагом в длинном ряду 96-луночного планшета, начиная с разведения 1 : 100 до 1 : 204 800. Связывание твердофазного антигена с иммунными сыворотками проходило в термостате в течение 1,5 ч. После завершения контакта планшеты промывали трижды по 200 мкл на лунку 0,01 М ФБР с 0,05% Твин-20. Иммунные комплексы выявляли с помощью конъюгата Protein A–Peroxidase («Sigma») в рабочем разведении 1 : 500 по 100 мкл на лунку в течение 1 ч в термостате. Далее план-

шеты отмывали пятикратно 0,01 М ФБР с 0,05% Твин-20 и детектировали иммунные комплексы субстратным раствором тетраметилбензида с перекисью водорода в течение 15 мин в темноте. Реакцию останавливали 4N H₂SO₄. Оптическую плотность измеряли на фотометре «Bio-Rad 680» при длине волны 450 нм.

Определение экспрессии рецепторов для α- и γ-интерферонов (ИФН) человека

Выделение лимфоцитов из венозной крови человека 0 группы Rh+ и пробоподготовка для прямой реакции иммунофлюоресценции подробно описаны в работах [6, 7]. Мононуклеарные клетки человека (МКЧ) выделяли из гепаринизированной крови в градиенте фиколла при плотности 1,077 г/см³ («PanEco»). Полученные МКЧ ресуспендировали в среде RPMI-1640 с 1% бычьего сывороточного альбумина, индуцировали антигенами VZV, культивировали в инкубаторе при 36,5°C и 5% CO₂ и в разные временные интервалы готовили образцы, индуцированные VZV МКЧ, для прямой реакции иммунофлюоресценции. Приготовленные образцы окрашивали ФИТЦ-конъюгатами на основе моноклональных антиидиотипических антител, структурно имитирующих α/β- и γ-ИФН человека. Эти антиидиотипические антитела являются антирецепторными для ИФН-α/β и ИФН-γ. После мечения маркерными препаратами их оценивали в люминесцентном микроскопе «Optika» при длине волны 510–550 нм.

Получение гемагглютинина VZV по E. Norrby [8]

Для постановки реакции торможения гемагглютинирующей активности (РТГА) специфических анти-VZV-иммунных сывороток [8] получили гемагглютинин из ВСЖ Ellen VZV.

ВСЖ получали путем инфицирования культуры клеток Vero-CCL 81 лабораторным штаммом Ellen VZV. ВСЖ осветляли центрифугированием при 1500 об/мин в течение 30 мин и обрабатывали Твин-80 и эфиром. Обработанный материал вновь центрифугировали при тех же условиях, в результате происходило расслаивание смеси. Гемагглютинирующий антиген находился в нижнем слое, который аккуратно отсасывали во флакон, закрывали стерильной марлевой салфеткой и оставляли на ночь для освобождения от паров эфира. Для определения титра вирусного гемагглютинина ставили реакцию гемагглютинации (РГА) со взвесью эритроцитов морской свинки.

РГА применяли для выбора рабочего разведения гемагглютинирующего антигена для постановки РТГА. В основе последней лежала задержка гемагглютинирующего действия вирусного антигена специфическими иммунными сыворотками.

РТГА. В реакции использовали рабочее разведение антигена, содержащее в 0,25 мл 2 единицы

антигена. До постановки реакции исследуемые сыворотки освобождали от термолабильных (прогревание при 56°C в течение 30 мин) и термостабильных (обработка фильтратом холерного вибриона) ингибиторов. Реакцию проводили по стандартной методике. За титр антител принимали предельное разведение сыворотки, полностью подавляющее гемагглютинирующую активность антигена.

Определение иммуногенности холодоадаптированных (ХА) вакцинных штаммов vFiraVax VZV и vZelVax HZV проводили на животной модели. Морским свинкам массой 300–400 г вводили подкожно одну прививочную дозу вакцины против ВО и ОГ. Через 2, 3 и 5 мес с момента иммунизации из сердца извлекали кровь для постановки реакции нейтрализации и РТГА.

Из иммунных сывороток были удалены термолабильные и термостабильные ингибиторы для реакции нейтрализации и РТГА. В качестве нейтрализующего вируса в реакции нейтрализации использовали вакцину VariVax (США), содержащую 1000 БОЕ_{50/0,5 мл} или 6 Ig ГАДЕ_{50/0,5 мл}.

Реакция нейтрализации была поставлена на клетках КМ 27. Реакцию нейтрализации учитывали на 7-е сутки с момента постановки, титр устанавливали на основе 100% защиты клеточных культур.

Статистическую обработку проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В процессе холодовой адаптации вирусы, как правило, приобретают мутации по температурочувствительности (ts-фенотип) и холодоадаптированности (са-фенотип). Эти два фенотипа являются основными лабораторными контролями кандидатов в вакцинные штаммы для живой вирусной вакцины, т.е. основными биологическими маркерами аттенуированных вирусных штаммов [9].

В табл. 1 и 2 представлены результаты титрования аттенуированных штаммов и диких родительских штаммов VZV и HZV на диплоидных клетках ФЭМС и MRC-5.

Представленные в табл. 1 и 2 результаты демонстрировали, что кандидаты в вакцинные вирусные штаммы vFiraVax VZV и vZelVax HZV не репродуцировались при непермиссивной температуре 39°C, т.е. обладали температурочувствительностью — ts-фенотипом, и репродуцировались более эффективно при субоптимальной температуре, т.е. обладали холодоадаптированностью — са-фенотипом.

Кандидаты в вакцинные штаммы должны также различаться по способности репродуцироваться в клеточной культуре ФЭМС. При этом аттенуированные штаммы VZV должны обладать более высокой репродуктивной активностью в этих клетках по сравнению с дикими вирусными изолятами.

Таблица 1. Определение ts- и ca-маркеров биологической аттенуации кандидатов в вакцинные штаммы VZV на клетках ФЭМС

Table 1. Identification of ts- and ca-markers of biological attenuation of candidate VZV vaccine strains on GPFF cells

Вирусный штамм Viral strain	Инфекционный титр VZV и HZV при различных температурных режимах, Ig ГАДЕ _{50/0,1 мл} The VZV and HZV infectious titer at different temperatures, Ig HAU _{50/0.1 ml}		
	30°C	36°C	39°C
vFiraVax VZV, 19-й пассаж, ВСЖ, 11 сут vFiraVax VZV, 19 th passage, vaccinated liquid, 11 days	9,0	7,75	0
vFiraVax VZV, 19-й пассаж, инфицированные клетки, 11 сут vFiraVax VZV, 19 th passage, infected cells, 11 days	12,8	11,8	0
pFira VZV, 2-й пассаж, ВСЖ, 11 сут pFira VZV, 2 nd passage, vaccinated liquid, 11 days	7,75	7,5	6,5
vZelVax HZV, 19-й пассаж, ВСЖ, 11 сут vZelVax HZV, 19 th passage, vaccinated liquid, 11 days	8,5	6,5	0
vZelVax HZV, 19-й пассаж, инфицированные клетки, 11 сут vZelVax HZV, 19 th passage, infected cells, 11 days	12,8	10,3	0
pZel HZV, 2-й пассаж, ВСЖ, 11 сут pZel HZV, 2 nd passage, vaccinated liquid, 11 days	7,5	7,5	6,5
vOKA/Merck (USA)	6,5	5,5	0

Примечание. Здесь и в табл. 2–6: v — вакцинный штамм, p — родительский штамм.
Note. Here and in Tables 2–6: v — a vaccine strain, p — a parental strain.

Таблица 2. Определение ts- и ca-маркеров биологической аттенуации кандидатов в вакцинные штаммы VZV на клетках MRC-5

Table 2. Identification of ts- and ca-markers of biological attenuation of candidate VZV vaccine strains on MRC-5 cells

Вирусный штамм Viral strain	Инфекционный титр VZV и HZV при различных температурных режимах, Ig ГАДЕ _{50/0,1 мл} The VZV and HZV infectious titer at different temperatures, Ig HAU _{50/0.1 ml}		
	30°C	36°C	39°C
vFiraVax VZV, 19-й пассаж, ВСЖ, 11 сут vFiraVax VZV, 19 th passage, vaccinated liquid, 11 days	9,5	7,75	0
vFiraVax VZV, 19-й пассаж, инфицированные клетки, 11 сут vFiraVax VZV, 19 th passage, infected cells, 11 days	12,8	10,8	0
pFira VZV, 2-й пассаж, ВСЖ, 11 сут pFira VZV, 2 nd passage, vaccinated liquid, 11 days	8,0	7,25	6,5
vZelVax HZV, 19-й пассаж, ВСЖ, 11 сут vZelVax HZV, 19 th passage, vaccinated liquid, 11 days	8,5	7,5	0
vZelVax HZV, 19-й пассаж, инфицированные клетки, 11 сут vZelVax HZV, 19 th passage, infected cells, 11 days	12,3	11,3	0
pZel HZV, 2-й пассаж, ВСЖ, 11 сут pZel HZV, 2 nd passage, vaccinated liquid, 11 days	8,0	8,0	6,5
vOKA/Merck (USA)	6,5	6,0	0

В табл. 3 представлены результаты определения титров аттенуированных и родительских вирусов VZV и HZV, репродуцирующихся в клетках ФЭМС и оцененных по реакции гемадсорбирующей активности на диплоидных клетках ФЭМС.

Результаты, представленные в табл. 3, показывали, что инфекционная активность родительских вариантов VZV, установленная на клетках ФЭМС,

на 1,5–2,0 lg ГАДЕ_{50/0,1 мл} ниже по сравнению с аттенуированными штаммами VZV. Это указывало на другой биологический маркер аттенуации кандидатных вакцинных штаммов для живых культуральных вакцин.

Нами разработаны новые маркеры биологической аттенуации кандидатных вакцинных штаммов VZV.

Таблица 3. Сравнительная репродуктивная активность аттенуированных и родительских вирусных штаммов VZV в клетках ФЭМС

Table 3. Comparative reproductive activity of attenuated and parental VZV virus strains in GPFF cells

Вирусный штамм Viral strain	Инфекционный титр VZV и HZV, Ig ГАДЕ _{50/0,1 мл} Infectious titer VZV and HZV, Ig HAU _{50/0,1 ml}
vFiraVax VZV, 19-й пассаж, ВСЖ, 14 сут vFiraVax VZV, 19 th passage, vaccinated liquid, 14 days	8,5
pFira VZV, 2-й пассаж, ВСЖ, 14 сут pFira VZV, 2 nd passage, vaccinated liquid, 14 days	6,5
vZelVax HZV, 19-й пассаж, ВСЖ, 14 сут vZelVax HZV, 19 th passage, vaccinated liquid, 14 days	8,0
pZel HZV, 2-й пассаж, ВСЖ, 14 сут pZel HZV, 2 nd passage, vaccinated liquid, 14 days	6,5

Антиидиотипические моноклональные антитела, направленные к рецепторам ИФН- α/β и ИФН- γ на иммунокомпетентных клетках человека, индуцированных *in vitro* VZV, использовали для оценки количественных показателей уровня экспрессии ИФН-рецепторов [6, 7]. Ранее на модели различных штаммов вируса кори нами показано, что уровень и продолжительность экспрессии ИФН-рецепторов находились в обратной зависимости от степени аттенуации вируса кори [10].

Таблица 4. Сравнительная экспрессия рецепторов для ИФН- α/β (в %) на МКЧ, индуцированных *in vitro* аттенуированными и родительскими штаммами VZV на разных пассажных уровнях

Table 4. Comparative expression of IFN- α/β receptors (%) on HMC induced *in vitro* by attenuated and parental VZV strains at different passage levels

Вирусный штамм Viral strain	Экспрессия рецепторов для ИФН- α/β на МКЧ в различные временные интервалы (в часах) Expression of IFN- α/β receptors on HMC at different time intervals (hours)			
	3	24	48	72
pFira VZV, 3-й пассаж pFira VZV, 3 rd passage	14,8 ± 0,9	23,9 ± 1,3	20,0 ± 0,6	6,6 ± 0,7
vFiraVax VZV, 17-й пассаж vFiraVax VZV, 17 th passage	3,6 ± 0,5*	8,1 ± 0,4**	4,5 ± 0,4**	1,6 ± 0,3**
pZel HZV, 3-й пассаж pZel HZV, 3 rd passage	13,5 ± 0,9	13,4 ± 1,0	17,8 ± 0,8	6,4 ± 0,5
vZelVax HZV 17-й пассаж vZelVax HZV, 17 th passage	4,3 ± 0,7**	9,4 ± 1,0*	9,0 ± 0,3**	4,3 ± 0,7*
Ellen# VZV	27,8 ± 3,2	18,8 ± 1,4	15,8 ± 2,3	11,6 ± 1,5

Примечание. Здесь и в табл. 5: уровень экспрессии ИФН-рецепторов определяли путем вычисления процентного соотношения светящихся клеток из общего числа 2000 клеток, подсчитанных на 4 образцах МКЧ для каждого временного интервала. # Вирус сконцентрирован ультрацентрифугированием и очищен в сахарозном градиенте.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ по сравнению с родительским штаммом.

Note. Here and in Table 5: The expression of IFN-receptors was estimated through calculating the percentage of light-producing cells in the total number of 2,000 cells, using 4 HMC samples for each time interval. # The virus was concentrated by ultracentrifugation and purified in sucrose density gradient.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ as compared to the parental strains.

Проведена сравнительная оценка показателей экспрессии рецепторов ИФН- α/β и ИФН- γ на МКЧ периферической крови, индуцированных кандидатными ХАО-штаммами vFiraVax VZV и vZelVax HZV на ранних и поздних пассажных уровнях. В табл. 4 и 5 представлены результаты этого исследования. Полученные данные показали, что оба вирусных ХАО-штамма VZV индуцировали более низкий уровень экспрессии рецепторов для ИФН- α/β и ИФН- γ в сравнении с их родительскими вариантами. Данный биологический маркер аттенуации кандидатных штаммов VZV назвали экспресс-ИФН-фенотипом. Этот фенотип может быть использован и для других аттенуированных вирусных вакцинных штаммов.

Еще одним биологическим маркером аттенуации для вакцинных штаммов VZV является вирулентность аттенуированных штаммов (att-фенотип). Нами обнаружено, что при заражении ХАО развивающихся куриных эмбрионов ВСЖ от дикого вируса эмбрионы гибли, а если оставались живыми, то на ХАО появлялась обширная геморрагия кровеносных сосудов. При заражении ХАО ВСЖ от аттенуированных штаммов VZV на ХАО обнаруживали белые оспины.

Важным свойством аттенуированных вакцинных вирусных штаммов является их иммуногенность. В табл. 6 приведены результаты титрования иммунных сывороток в реакции нейтрализации и РТГА.

Результаты, представленные в табл. 6, показали, что нейтрализующая активность иммунных

Таблица 5. Сравнительная экспрессия рецепторов для ИФН-γ (в %) на МКЧ, индуцированных *in vitro* аттенуированными и родительскими штаммами VZV на разных пассажных уровнях

Table 5. Comparative expression of IFN-γ receptors (%) on HMC induced *in vitro* by attenuated and parental VZV strains at different passage levels

Вирусный штамм Viral strain	Экспрессия рецепторов ИФН-γ на МКЧ в различные временные интервалы (в часах) Expression of IFN-γ receptors on HMC at different time intervals (hours)			
	3	24	48	72
pFira VZV, 3-й пассаж pFira VZV, 3 rd passage	5,8 ± 1,0	14,9 ± 1,1	15,1 ± 0,9	12,0 ± 0,4
vFiraVax VZV, 17-й пассаж vFiraVax VZV, 17 th passage	3,6 ± 0,5*	8,1 ± 0,4**	4,5 ± 0,4**	6,0 ± 0,3**
pZel HZV, 3-й пассаж pZel HZV, 3 rd passage	7,9 ± 0,8	14,4 ± 0,9	14,3 ± 1,2	11,13 ± 0,5
vZelVax HZV, 17-й пассаж vZelVax HZV, 17 th passage	4,8 ± 0,9*	4,9 ± 0,9**	7,1 ± 0,9**	5,2 ± 0,02**
Ellen VZV	16,6 ± 1,6	12,5 ± 0,35	10,4 ± 0,6	9,0 ± 0,71

вируспецифических сывороток по отношению к кандидатным вакцинным штаммам vFiraVax VZV и vZelVax HZV как в реакции нейтрализации, так и в РТГА была высокой. При этом надо отметить, что титры иммунных сывороток в реакции нейтрализации оставались высокими на протяжении всех 5 мес исследования, в то время как титры иммунных сывороток в РТГА к этому сроку снизились почти в 4 раза. Известно, что вирусные гемагглютинины менее стабильны по сравнению с вирусными нейтрелинами.

Обсуждение

В данном исследовании мы изучали биологические маркеры аттенуации созданных нами ХА кандидатных штаммов VZV и HZV для создания живых культуральных вакцин против ВО у детей и ОГ у взрослых после 50 лет.

Экспериментально было установлено, что оба ХА-штамма обладали основными биологическими маркерами аттенуации: ts- и sa-фенотипом (табл. 1, 2). Для вирусных штаммов VZV характерен еще один дополнительный фенотип, названный нами cell-фенотипом, т.е. изменение тканевого тропизма. Дикие варианты клинических изолятов VZV, как правило, обладают более низкой репродуктивной активностью в первичных клетках эмбрионов морской свинки в сравнении с аттенуированными вирусными штаммами. Экспериментально установлено, что ХА-штаммы vFiraVax VZV и vZelVax HZV обладали cell-фенотипом (табл. 3).

В настоящее время не существует модельного объекта для оценки вирулентности VZV — att-фенотипа. Нами обнаружено, что подходящей моделью является ХАО развивающихся куриных эмбрионов. Установлено, что родительские варианты

Таблица 6. Иммуногенность аттенуированных вакцинных штаммов vFiraVax VZV и vZelVax HZV, установленная иммунизацией морских свинок с оценкой в реакции нейтрализации на культуре клеток и в РТГА в различные временные интервалы

Table 6. Immunogenicity of attenuated vFiraVax VZV and vZelVax HZV vaccine strains through immunization of guinea pigs and a neutralization test on cell culture and in HAI assay at different time intervals

Иммунные сыворотки к вакцинным штаммам VZV Immune sera for VZV vaccine strains	Реакция нейтрализации (со 100% защитой) Neutralization test (at 100% protection)			РТГА (гемагглютинин, штамм Ellen VZV) HAI assay (hemagglutinin, Ellen VZV strain)		
	срок с момента иммунизации, мес time since immunization, months					
	2	3	5	2	3	5
vFiraVax VZV, 20-й пассаж vFiraVax VZV, 20 th passage	1 : 1600	1 : 1600	1 : 1600	1 : 25600	1 : 12800	1 : 6400
vZelVax HZV, 20-й пассаж vZelVax HZV, 20 th passage	1 : 1600	1 : 1600	1 : 1600	1 : 25600	1 : 12800	1 : 6400
Нейтрализующий VZV-штамм vOka, 1000 доз Neutralizing VZV strain vOka, 1000 doses				6,0 Ig ГАДЕ _{50/0,1 мл} 6.0 Ig HAU _{50/0,1 ml}		

вирусов VZV вызывают гибель эмбрионов или обширную геморрагию ХАО, а ХА вирусные штаммы VZV вызывали образование белых оспин. Кандидатные ХА-штаммы vFiraVax VZV и vZelVax HZV оказались авирулентными и обладали att-фенотипом. Этот же метод можно использовать для оценки генетической стабильности вакцинных вирусных штаммов VZV.

Нами предложен новый маркер биологической аттенуации кандидатных вакцинных штаммов. Так, ранее нами был разработан новый методический подход к оценке функционального состояния системы ИФН [6, 7]. С этой целью использовали высокочувствительные и специфичные флюоресцирующие зонды на основе моноклональных антиидиотипических антител, имитирующих биологические эффекты ИФН- α/β и ИФН- γ человека. Обследование образцов крови доноров с различными группами крови не выявило на МКЧ экспрессии рецепторов для ИФН- α и ИФН- γ , что указывало на сбалансированное функционирование системы ИФН в организме [7]. При индукции *in vitro* МКЧ периферической крови доноров различными штаммами вирусов кори установлено, что уровень и продолжительность экспрессии рецепторов для различных типов ИФН находились в обратной зависимости от степени аттенуации вируса кори [10].

В наших экспериментах ХА-штаммы VZV и HZV экспрессировали на мембранах МКЧ более низкий уровень рецепторов для ИФН- α/β и ИФН- γ (табл. 4 и 5), и эти показатели были стабильными, что позволило нам считать этот экспресс-ИФН-фенотип характерным для всех аттенуированных вакцинных штаммов.

Самым важным свойством живых ХА-вакцин является их более высокая эффективность по сравнению с инактивированными вакцинами, поскольку они обладают способностью вызывать более эффективные врожденный и адаптивный гуморальный и клеточный иммунные ответы [11, 12].

Иммуногенность аттенуированных вакцинных штаммов vFiraVax и vZelVax изучали путем подкожной иммунизации морских свинок. Оценивали гуморальный иммунный ответ в реакциях нейтрализации против 1000 доз вируса, содержащихся в вакцине OkaVax/Merck (США), и в РТГА против 2-гемагглютинирующих единиц гемагглютинина, полученного из лабораторного вирусного штамма Ellen VZV. ХА-вакцинные штаммы vFiraVax VZV и vZelVax HZV обладали высокой иммуногенностью на протяжении 5 мес наблюдения (табл. 6).

Таким образом, нами созданы и охарактеризованы два ХА-вакцинных штамма: vFiraVax VZV и vZelVax HZV — кандидаты для создания живых культуральных вакцин для профилактики ВО у детей и ОГ у взрослых.

ЛИТЕРАТУРА

- Greenberg H.B., Arvin A.M. Live attenuated vaccines: influenza, rotavirus and varicella zoster virus. In: Dormitzer P., Mandl C., Rappuoli R., eds. *Replicating Vaccines. Birkhäuser Advances in Infectious Diseases*. Basel: Springer Basel; 2011. DOI: http://doi.org/10.1007/978-3-0346-0277-8_2
- Gould D. Varicella zoster virus: chickenpox and shingles. *Nurs. Stand.* 2014; 28(33): 52-8. DOI: <http://doi.org/10.7748/ns2014.04.28.33.52.e8249>
- Kennedy P.G.E., Gershon A.A. Clinical features of varicella – zoster virus infection. *Viruses*. 2018; 10(11): 609-20. DOI: <http://doi.org/10.3390/v10110609>
- Sadaoka T., Mori Y. Vaccine development for varicella – zoster virus. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2018; 1045: 123-42. DOI: http://doi.org/10.1007/978-981-10-7230-7_7
- Seward J.F., Marin M., Vázquez M. Varicella vaccine effectiveness in the US vaccination program: a review. *J. Infect. Dis.* 2008; 197(Suppl. 2): S82-9. DOI: <http://doi.org/10.1086/522145>
- Баркова Е.П., Нагиева Ф.Г., Кузнецов В.П., Беляев Д.Л., Никулина В.Г., Бабаянц А.А. и др. Экспрессия рецепторов для человеческих α - и γ -интерферонов на поверхности монукулеарных клеток периферической крови при вирусных инфекциях. *Вопросы вирусологии*. 1999; 44(1): 16-8.
- Баркова Е.П., Вдовина Е.Т., Нагиева Ф.Г., Ющук Н.В., Знойко О.О., Никулина В.Г. и др. Функциональная активность интерфероновых рецепторов монукулеаров периферической крови пациентов с вирусными гепатитами. *Биопрепараты*. 2001; (4): 18-21.
- Norrby E. Hemagglutination by measles virus. 4. A simple procedure for production of high potency antigen for hemagglutination-inhibition (HI) tests. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1962; 3(3): 814-8. DOI: <http://doi.org/10.3181/00379727-111-27930>
- Исакова И.Н., Киселева И.В., Ларионова Н.В., Олейник Е.С., Руденко Л.Г. Лабораторные маркеры аттенуации штаммов живой гриппозной вакцины. *Вопросы вирусологии*. 2007; 52(4): 22-6.
- Баркова Е.П., Нагиева Ф.Г., Лавров В.Ф., Никулина В.Г., Ляшенко В.А. Экспрессия интерфероновых рецепторов и мембраносвязанных интерферонов на поверхности иммунокомпетентных клеток, инфицированных различными штаммами вируса кори. *Актуальные вопросы эпидемиологии инфекционных болезней*. 2006; (8): 123-5.
- Badgett M.R., Auer A., Carmichael L.E., Parrish C.R., Bull J.J. Evolutionary dynamics of viral attenuation. *J. Virol.* 2002; 76(20): 10524-9. DOI: <http://doi.org/jvi.76.20.10524-10529.2002>
- Martínez-Sobrido L., Peersen O., Nogales A. Temperature sensitive mutations in influenza A viral ribonucleoprotein complex responsible for the attenuation of the live attenuated influenza vaccine. *Viruses*. 2018; 10(10): 560. DOI: <http://doi.org/10.3390/v10100560>

REFERENCES

- Greenberg H.B., Arvin A.M. Live attenuated vaccines: influenza, rotavirus and varicella zoster virus. In: Dormitzer P., Mandl C., Rappuoli R., eds. *Replicating Vaccines. Birkhäuser Advances in Infectious Diseases*. Basel: Springer Basel; 2011. DOI: http://doi.org/10.1007/978-3-0346-0277-8_2
- Gould D. Varicella zoster virus: chickenpox and shingles. *Nurs. Stand.* 2014; 28(33): 52-8. DOI: <http://doi.org/10.7748/ns2014.04.28.33.52.e8249>
- Kennedy P.G.E., Gershon A.A. Clinical features of varicella – zoster virus infection. *Viruses*. 2018; 10(11): 609-20. DOI: <http://doi.org/10.3390/v10110609>
- Sadaoka T., Mori Y. Vaccine development for varicella – zoster virus. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2018; 1045: 123-42. DOI: http://doi.org/10.1007/978-981-10-7230-7_7

5. Seward J.F., Marin M., Vázquez M. Varicella vaccine effectiveness in the US vaccination program: a review. *J. Infect. Dis.* 2008; 197(Suppl. 2): S82-9.
DOI: <http://doi.org/10.1086/522145>
6. Barkova E.P., Nagieva F.G., Kuznetsov V.P., Belyaev D.L., Nikulina V.G., Babayants A.A., et al. Expression of receptors for human alpha- and gamma-interferons on the surface of peripheral blood mononuclear cells in viral infections. *Voprosy virusologii.* 1999; 44(1): 16-8. (in Russian)
7. Barkova E.P., Vdovina E.T., Nagieva F.G., Yushchuk N.V., Znoyko O.O., Nikulina V.G., et al. Functional activity (capacity) of interferon receptors of peripheral blood mononuclear cells of patients with viral hepatitis. *Biopreparaty.* 2001; (4): 18-21. (in Russian)
8. Norrby E. Hemagglutination by measles virus. 4. A simple procedure for production of high potency antigen for hemagglutination-inhibition (HI) tests. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1962; 3(3): 814-8. DOI: <http://doi.org/10.3181/00379727-111-27930>
9. Isakova I.N., Kiseleva I.V., Larionova N.V., Oleynik E.S., Rudenko L.G. Live influenza vaccine: laboratory markers of attenuation. *Voprosy virusologii.* 2007; 52(4): 22-6. (in Russian)
10. Barkova E.P., Nagieva F.G., Lavrov V.F., Nikulina V.G., Lyashenko V.A. Expression of interferon receptors and membrane-bound interferons on the surface of immunocompetent cells infected with various strains of the measles virus. *Aktual'nye voprosy epidemiologii infektionnykh bolezney.* 2006; (8): 123-5. (in Russian)
11. Badgett M.R., Auer A., Carmichael L.E., Parrish C.R., Bull J.J. Evolutionary dynamics of viral attenuation. *J. Virol.* 2002; 76(20): 10524-9.
DOI: <http://doi.org/jvi.76.20.10524-10529.2002>
12. Martínez-Sobrido L., Peersen O., Nogales A. Temperature sensitive mutations in influenza A viral ribonucleoprotein complex responsible for the attenuation of the live attenuated influenza vaccine. *Viruses.* 2018; 10(10): 560.
DOI: <http://doi.org/10.3390/v10100560>

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>.

Зверев Виталий Васильевич — д.б.н., проф., академик РАН, научный руководитель института 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. 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>.

Alexander 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>.

Vitaly V. Zverev — D. Sci. (Biol.), Prof., Academician of the Russian Academy of Sciences, Academic Adviser, 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.

© Медкова А.Ю., Синяшина Л.Н., Амичба А.А., Семин Е.Г., Шевцова З.В., Матуа А.З., Джидарян А.А., Кубрава Д.Т., Конджария И.Г., Баркая В.С., Миквабия З.Я., Каратаев Г.И., 2020



Доклинические исследования безопасности, иммуногенности и защитной активности аттенуированных бактерий *Bordetella pertussis* на экспериментальной модели *Macaca mulatta*

Медкова А.Ю.^{1,2}, Синяшина Л.Н.¹, Амичба А.А.³, Семин Е.Г.¹, Шевцова З.В.^{3,4}, Матуа А.З.^{3,4}, Джидарян А.А.³, Кубрава Д.Т.³, Конджария И.Г.^{3,4}, Баркая В.С.³, Миквабия З.Я.³, Каратаев Г.И.^{1✉}

¹ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи», 123098, Москва, Россия;

²ФГБУ «Центральная клиническая больница с поликлиникой» Управления делами Президента РФ, 121359, Москва, Россия;

³НИИ экспериментальной патологии и терапии Академии наук Абхазии, 384900, Сухум, Абхазия;

⁴Абхазский государственный университет, 384904, Сухум, Абхазия

Введение. Рост заболеваемости коклюшем среди разных групп населения и несовершенство существующих профилактических препаратов требуют разработки новых безопасных вакцин, удобных для иммунизации детей раннего младенческого возраста, реиммунизации подростков и взрослых.

Целью настоящей работы является характеристика безопасности, иммуногенности и защитной активности сконструированных нами аттенуированных бактерий *Bordetella pertussis* 4МКС в тесте интраназального заражения иммунизированных обезьян *Macaca mulatta* вирулентными бактериями возбудителя коклюша.

Материалы и методы. Для иммунизации и экспериментальной инфекции использованы 5 половозрелых, клинически здоровых обезьян *Macaca mulatta* в возрасте 3–4 лет. Реиммунизацию проводили через 6 мес. В качестве контроля использовали 3 неиммунизированных животных того же возраста.

Результаты. Интраназальная однократная и повторная инокуляции аттенуированных бактерий *B. pertussis* не вызывали воспалительных процессов в носоглотке обезьян *Macaca mulatta* и изменений лабораторных показателей крови, наблюдаемых после экспериментальной инфекции нечеловекообразных приматов вирулентными бактериями. Не зарегистрировано увеличения количества общих IgE в сыворотке крови обезьян *Macaca mulatta* после однократной и двукратной иммунизации. Интраназальная иммунизация обезьян *Macaca mulatta* аттенуированными и вирулентными бактериями *B. pertussis* приводит к формированию защитной реакции организма на повторную инфекцию, проявляющейся в подавлении размножения бактерий, ускорении темпов их элиминации из носоглотки животных и развитии гуморального иммунного ответа на инфекцию. Развитие иммунитета к повторной коклюшной инфекции сопровождается выраженным бустерным эффектом.

Обсуждение. Представленные результаты указывают на общие механизмы формирования поствакцинального иммунитета в результате интраназальной вакцинации животных и постинфекционного противокклюшного иммунитета, обеспечивающих защиту от повторного инфицирования бактериями *B. pertussis* и развития клинических симптомов коклюша.

Ключевые слова: коклюш; живая вакцина интраназального применения; защитная активность; аттенуированные бактерии *Bordetella pertussis*; нечеловекообразные обезьяны.

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: Медкова А.Ю., Синяшина Л.Н., Амичба А.А., Семин Е.Г., Шевцова З.В., Матуа А.З., Джидарян А.А., Кубрава Д.Т., Конджария И.Г., Баркая В.С., Миквабия З.Я., Каратаев Г.И. Доклинические исследования безопасности, иммуногенности и защитной активности аттенуированных бактерий *Bordetella pertussis* на экспериментальной модели *Macaca mulatta*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2020; 97(4): 312–323.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-3>

Поступила 12.06.2020

Принята в печать 08.07.2020

Preclinical studies of safety, immunogenicity and protective activity of attenuated *Bordetella pertussis* bacteria on the *Macaca mulatta* model

Alisa Yu. Medkova^{1,2}, Lyudmila N. Sinyashina¹, Astanda A. Amichba³, Evgeniy G. Semin¹,
Zinaida V. Shevtsova^{3,4}, Alisa Z. Matua^{3,4}, Anush A. Djidaryan³, Dzhenni T. Kubrava³,
Irina G. Kondzhariya^{3,4}, Vladimir S. Barkaya³, Zurab Ya. Mikvabiya³, Gennadiy I. Karataev^{1✉}

¹Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, 123098, Moscow, Russia;

²Central Clinical Hospital with a Polyclinic, Office of the President of the Russian Federation, 121359, Moscow, Russia;

³Research Institute of Experimental Pathology and Therapy of the Academy of Sciences of Abkhazia, 384900, Sukhumi, Abkhazia;

⁴Abkhazian State University, 394904, Sukhumi, Abkhazia

Introduction. An increasing incidence of pertussis among different groups of population and shortcomings of the existing preventive solutions pinpoint urgency of development of new safe vaccines suitable for immunization of infants and for booster immunization of adolescents and adults.

The purpose of this study is evaluation of safety, immunogenicity and protective activity of the new constructed attenuated *Bordetella pertussis* bacteria 4MKS by infecting immunized *Macaca mulatta* monkeys intranasally with virulent bacteria of the pertussis pathogen.

Materials and methods. Five adult, clinically healthy *Macaca mulatta* monkeys aged 3–4 years were used for immunization and experimental infection. The re-immunization was performed in 6 months. Three non-immunized animals of the same age were used as controls.

Results. The intranasal single-dose inoculation and re-inoculation of attenuated *B. pertussis* bacteria did not cause any nasopharyngeal inflammation in the rhesus monkeys and any changes in the blood lab test values after the nonhuman primates had been infected with virulent bacteria. No elevation of total IgE was detected in blood serum of the *Macaca mulatta* monkeys after the single-dose and double-dose immunization. When the monkeys were intranasally immunized with attenuated and virulent *B. pertussis* bacteria, they developed a defensive reaction to re-infection, namely suppression of the bacterial growth, increased rates of elimination of bacteria from the animals' nasopharynxes and development of a humoral immune response to the infection. The development of immunity against pertussis re-infection is accompanied by a pronounced booster effect.

Discussion. The obtained results suggest common mechanisms of development both of post-vaccination immunity after intranasal vaccination of animals and infection-acquired immunity against pertussis. Both of them provide protection against re-infection with *B. pertussis* bacteria and prevent development of clinical symptoms of pertussis.

Keywords: *pertussis; live intranasal vaccine; protective activity; attenuated Bordetella pertussis bacteria; nonhuman primates.*

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: Medkova A.Yu., Sinyashina L.N., Amichba A.A., Semin E.G., Shevtsova Z.V., Matua A.Z., Djidaryan A.A., Kubrava D.T., Kondzhariya I.G., Barkaya V.S., Mikvabiya Z.Ya., Karataev G.I. [Preclinical studies of safety, immunogenicity and protective activity of attenuated *Bordetella pertussis* bacteria on the *Macaca mulatta* model]. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(4): 312–323. (In Russ.).
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-3>

Received 12 June 2020
Accepted 8 July 2020

Введение

Несмотря на массовую противокклюшную вакцинацию, проводимую в разных странах с начала 1950-х гг., элиминации возбудителя коклюша среди населения не происходит. На фоне гиподиагностики коклюша ежегодно в мире регистрируется более 16 млн случаев заболевания разной степени тяжести, из которых около 200 тыс. заканчиваются летальным исходом [1]. В последнее десятилетие отмечается значительный рост числа лабораторно подтвержденных случаев коклюша среди подростков и взрослых [2, 3], распространение стертых форм заболевания, выявлены бессимптомные носительства бактерий *Bordetella pertussis* (BP) [2, 4, 5].

В США, где охват детей прививками с коклюшной вакциной (КВ) составляет 95%, с начала 2000-х гг. отмечен значительный рост заболеваемости коклюшем, приближающейся к довакцинному периоду [6, 7]. Растет заболеваемость в Италии и Англии [8, 9]. В России в 2018 г. зарегистрировано более чем 2-кратное увеличение числа случаев коклюша по сравнению с 2017 г. Тенденция роста заболеваемости сохранялась как в 2019 г., так и в начале 2000 г. [10]. В предыдущие годы рост заболеваемости регистрировали главным образом в Москве и Санкт-Петербурге, что связано, вероятно, с качеством диагностики [11].

Для профилактики коклюша в настоящее время используют вакцины, содержащие корпускулярный

коклюшный компонент (цельноклеточные КВ — ЦКВ) или бесклеточный коклюшный компонент (бесклеточные КВ — БКВ) в сочетании с инактивированными дифтерийным и столбнячным анатоксинами. Иногда ЦКВ или БКВ используют как моновакцины. Считается, что БКВ менее реактогенна, но прямые исследования на приматах показали, что она не обеспечивает антибактерийного иммунитета и не защищает животных от экспериментальной коклюшной инфекции [12]. На невысокую эффективность ревакцинации подростков и взрослых БКВ указывает ее сравнительное определение заболеваемости вакцинированной и невакцинированной популяций [13, 14].

Другим важным недостатком современных КВ является невысокая длительность сформированного иммунитета. Изучение эффективности КВ разного типа показало, что длительность поствакцинального иммунитета не превышает 5 лет. После перенесенного заболевания иммунитет сохраняется до 10–15 лет [15].

Все современные КВ вводятся детям старше 2 мес не менее 3 раз. Таким образом, полный цикл вакцинации завершается не раньше чем к 6-месячному возрасту ребенка, что сохраняет высокий риск в первые, самые опасные в отношении заболевания коклюшем, месяцы его жизни.

Рост заболеваемости коклюшем, в том числе среди старших детей и взрослого населения, привел к пониманию необходимости ревакцинации подростков и взрослых. Рассматривается необходимость вакцинации матерей и формирования «семейного иммунитета» [3, 4, 16, 17]. Для этих целей рекомендована только БКВ [4], которая, как упомянуто выше, не обеспечивает защиту детей и взрослых от заражения и распространения инфекции. Таким образом, приходится констатировать, что, несмотря на целесообразность ревакцинации подростков и взрослых, формирования семейного иммунитета, в настоящее время отсутствует вакцина для этих целей. ЦКВ не рекомендована ВОЗ к применению у взрослых, а современная БКВ, скорее всего, неэффективна. БКВ продемонстрировала свою эффективность и безопасность в качестве альтернативы ЦКВ для вакцинации младенцев. Такая вакцинация контролирует смертность и тяжесть заболевания детей младенческого, наиболее уязвимо-го для коклюша возраста. Однако, как и ЦКВ, она требует 3–4-кратной вакцинации и плохо защищает детей от инфицирования и заболевания при незавершенном цикле вакцинации.

В рамках доклинических исследований нами показаны безопасность интраназального введения аттенуированных бактерий *BP* 4MKS лабораторным животным и защитный эффект вакцинации мышей в отношении их внутримозгового и интраназального заражения вирулентными бактериями

BP [18]. Исследования последних лет продемонстрировали перспективность экспериментальной модели нечеловекообразных обезьян для изучения иммунобиологических характеристик возбудителя коклюша и иммуногенности КВ [19–23]. Показано, что экспериментальная инфекция обезьян приводит к развитию лабораторных показателей коклюшной инфекции, гиперемии носоглотки, длительной персистенции *BP* и нарастанию титра специфических иммуноглобулинов в сыворотке крови животных. Исследования на павианах гамадрилах продемонстрировали возможность передачи инфекции от человека к обезьяне и между обезьянами [23].

Целью настоящей работы является характеристика безопасности, иммуногенности и защитной активности сконструированных нами аттенуированных бактерий *BP* 4MKS в тесте интраназального заражения иммунизированных обезьян *Macaaca mulatta* (макака резус; МР) вирулентными бактериями возбудителя коклюша.

Материалы и методы

BP культивировали на твердых питательных средах КУА с добавлением 10% дефибринированной крови барана при 36°C. Аттенуированные *BP* 4MKS из назофарингеальных смывов высеивали на КУА, содержащую 200 мкг/мл стрептомицина.

Для определения серотипового состава культуры использовали сыворотки диагностические коклюшные к агглютиногенам бактерий *BP* 1, 2, 3 адсорбированные, для реакции агглютинации, сухие (ФГБУ НИЦЭМ им Н.Ф. Гамалеи) в соответствии с рекомендациями производителя.

Иммунизацию и экспериментальное инфицирование проводили у 5 половозрелых, клинически здоровых МР в возрасте 3–4 лет. Реиммунизацию проводили через 6 мес. В качестве контроля использовали 3 неиммунизированных МР того же возраста. Работа с животными осуществлялась на базе Сухумского питомника обезьян (НИИ экспериментальной патологии и терапии Академии наук Абхазии). Использование животных соответствовало принципам Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей, а также требованиям отечественных нормативных документов.

Защитную активность аттенуированных бактерий определяли по сравнению динамики выведения вирулентных бактерий *BP* 475 из носоглотки вакцинированных и контрольных — неиммунизированных МР, развитию иммунологических реакций, а также клинических симптомов и лабораторных признаков коклюша.

Перед манипуляциями (иммунизацией, экспериментальной инфекцией, взятием назофарингеальных мазков) МР подвергали наркозу внутримышечным введением 0,03–0,04 мл золетила

(«Virbac», Франция) в концентрации 100 мг/мл (с премедикацией ксилазингидрохлоридом, 20 мг/мл). Экспериментальную инфекцию и вакцинацию (10^7 – 10^{10} бактерий) осуществляли путем введения 0,5 мл суспензии вирулентных или аттенуированных бактерий в каждую ноздрю животного в положении лежа на спине.

Кровь на анализ у МР брали без наркоза с использованием «прижимных клеток».

Для выявления ДНК бактерий *BP* использован смыв назофарингеальных тампонов в 500 мкл физиологического раствора. После центрифугирования ДНК выделяли с помощью стандартной обработки раствором гуанидинтиоцианата с последующей сорбцией на магнитном сорбенте («Promega»). Идентификацию ДНК бактерий *BP* проводили с помощью разработанной нами тест-системы ПЦР в реальном времени [24, 25].

Определение специфических к коклюшному токсину и филаментозному гемагглютинирующему IgG, IgM и неспецифических IgE в сыворотках крови МР после одно- и двукратной интраназальной вакцинации проводили с применением тест-систем «Ridascreen». Неспецифические IgE определяли с помощью тест-системы «Вектор-Бест».

Результаты проанализированы по тесту Стьюдента. Различия значимы при $p \leq 0,05$.

Результаты

Общее состояние МР и анализ крови после иммунизации и заражения вирулентными *BP* 475

Первая и повторная интраназальные иммунизации МР не привели к отклонениям от нормы в поведении, общем состоянии животных, формуле крови, количестве лейкоцитов и глюкозы, активности аспартат- и аланинаминотрансферазы, к возникновению воспалительных или других реакций в носоглотке (табл. 1).

Экспериментальная инфекция иммунизированных обезьян вирулентными бактериями *BP* через 12 мес после реиммунизации также не выявила отклонений измеренных параметров от нормы (табл. 1). При этом в контрольном эксперименте, при заражении нативных обезьян вирулентными бактериями, зарегистрированы достоверное увеличение количества лейкоцитов и снижение содержания глюкозы (табл. 1), наличие слизи и воспаления носоглотки на 3–10-е сутки инфекции. Кашля у контрольных и опытных обезьян не зарегистрировано.

Результаты измерений неспецифических IgE в сыворотке крови иммунизированных и инфицированных животных представлены в табл. 2.

Из табл. 2 видно, что из иммунизированных животных только у обезьяны 31883, а из контрольных

Таблица 1. Биохимический анализ крови МР после интраназальной иммунизации аттенуированными бактериями *BP* и экспериментальной инфекции вирулентными бактериями *BP* 475

Table 1. RMs' blood biochemistry after their intranasal immunization with attenuated *BP* bacteria and experimental infection with virulent *BP* 475 bacteria

Интраназальная инокуляция Intranasal inoculation	Дни Days	Аланинамино- трансфераза, Ед/мл Alanine aminotransferase, U/ml	Аспартатамино- трансфераза, Ед/мл Aspartate aminotransferase, U/ml	Глюкоза, Мм/л Glucose, Mm/l	Лейкоциты, $\times 10^3$ White blood cells, $\times 10^3$
Первая иммунизация First immunization	Фон Background	34,5 ± 4,4	36,5 ± 12,5	5,4 ± 1,1	10,1 ± 2,8
	3	38,8 ± 10,2	36,2 ± 10,4	4,7 ± 0,3	8,2 ± 1,9
	7	42,1 ± 6,1	33,1 ± 2,6	5,5 ± 0,5	9,8 ± 2,7
	14	46,1 ± 6,7	41,1 ± 10,6	4,7 ± 0,7	8,8 ± 2,3
Повторная иммунизация Re-immunization	Фон Background	39,1 ± 4,6	43,5 ± 11,5	4,4 ± 0,6	9,1 ± 2,6
	3	37,2 ± 3,9	38,2 ± 8,4	4,7 ± 0,4	7,2 ± 1,9
	7	40,0 ± 3,1	34,1 ± 5,6	5,3 ± 0,5	8,0 ± 3,1
	14	41,8 ± 4,0	39,1 ± 7,1	4,7 ± 0,4	8,3 ± 2,5
Инфекция бактериями <i>BP</i> 475 нативных обезьян Infection of native monkeys with <i>BP</i> 475 bacteria	Фон Background	42,2 ± 6,4	42,0 ± 6,5	6,2 ± 0,3	12,1 ± 1,4
	3	44,2 ± 4,9	39,2 ± 7,4	5,7 ± 0,7	17,8 ± 2,9
	7	40,4 ± 4,1	41,1 ± 5,5	4,4 ± 0,6*	19,3 ± 2,9*
	14	39,8 ± 3,8	40,1 ± 5,1	4,7 ± 0,4*	19,3 ± 2,9*

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с фоном.

Note. * $p < 0.05$ as compared to the background.

Таблица 2. Значения IgE в сыворотке крови МР, вакцинированных и ревакцинированных аттенуированными бактериями *BP*

Table 2. Values of IgE in blood sera of RMs vaccinated and re-vaccinated with attenuated *BP* bacteria

День после инфекции Day after infection	Номер обезьяны Monkey identification number									
	31881	31882	31883	31901	31908	31926	31927	31843	31870	31888
Первая иммунизация First immunization										
Фон Background	320	250	66	680	678					
7	290	190	73	–	–					
14	285	220	56	845	693					
24	427	350	48	690	578					
64	469	191	53	662	750					
180	668	117	63	609	555					
Реиммунизация через 6 мес Re-immunization in 6 months										
Фон Background	668	117	63	609	555					
7	720	141	31	745	449					
14	518	187	43	722	458					
24	562	203	62	648	–					
64	669	177	47	393	524					
180	580	258	–	–	180					
Заражение вирулентными бактериями <i>BP</i> Infection with virulent <i>BP</i> bacteria										
Фон Background	219	22	45	58	55	656	48	559	376	257
7	73	13	15	45	32	732	37	635	281	201
14	48	13	17	10	14	651	25	759	351	224
28	43	7	9	23	9	515	52	569	390	356

ных — 31927 содержатся IgE в количестве, близком к значениям отрицательного контроля у человека (20–30 МЕ/мл). У всех обезьяны 31882 значения IgE варьируют от 117 до 350 ед., у остальных — 200–850 ед.

Не зарегистрировано регулярного увеличения количества IgE после их иммунизации и реиммунизации. Напротив, у обезьяны 31882 наблюдается тенденция к снижению количества IgE уже после реиммунизации, и у всех животных регистрируется значительное уменьшение числа IgE после заражения вирулентными бактериями *BP* 475.

Бактериальная нагрузка *BP* в носоглотке обезьян после иммунизации и заражения вирулентными *BP* 475

Золотым стандартом для диагностики коклюша является бактериологический метод. Мы произво-

дили высеив материала смывов назофарингеальных тампонов, собранного с задней стенки носоглотки обезьян, на среду КУА с кровью, содержащую или не содержащую стрептомицин. Мазки брали через 1 ч после иммунизации или экспериментальной инфекции и далее в динамике через 3, 7, 10, 14 сут и т.д. Рост бактерий на среде КУА оценивали на 4–5-е сутки после посева. Выросшие колонии типировали с помощью специфических сывороток к агглютиногенам 1, 2 и 3. Рост бактерий *BP* на чашках удавалось регистрировать в течение первых 2 нед, в редких случаях — 3–4 нед после инокуляции. Дополнительную сложность представляло наличие посторонней микрофлоры, особенно при анализе материала на среде КУА без антибиотика. Поэтому, а также учитывая низкую эффективность метода бактериального посева, для диагностики коклюша и характеристики количества бактерий в

ротоносоглотке животных использован разработанный нами метод ПЦР в реальном времени.

На рис. 1 и 2 представлена динамика изменения количества геном-эквивалентов бактерий в условном миллилитре смыва назофарингеального тампона (аспирата) обезьян, однократно и двукратно инфицированных вирулентными и аттенуированными бактериями *BP*.

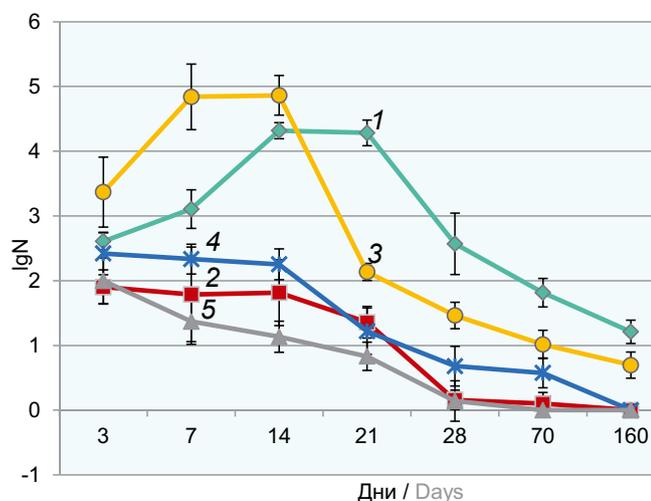


Рис. 1. Динамика изменения количества геном-эквивалентов бактерий *BP* в носоглотке МР после первого и повторного интраназального введения бактерий *BP*.

N — количество геном-эквивалентов бактерий *BP* в 1 мл назофарингеального аспирата. 1 — первое введение вирулентных бактерий *BP*; 2 — повторное введение вирулентных бактерий *BP*; 3 — первое введение аттенуированных бактерий *BP*; 4 — повторное введение аттенуированных бактерий *BP*; 5 — инфицирование вирулентными *BP* через 12 мес после введения аттенуированных бактерий *BP*.

Fig. 1. Changes in the number of *BP* genome-equivalents in the RMs' nasopharynx after the first and repeated intranasal vaccination with *BP* bacteria.

N — the number of *BP* genome-equivalents in 1 ml of the nasopharyngeal aspirate. 1 — the first vaccination with virulent *BP* bacteria; 2 — the repeated vaccination with virulent *BP* bacteria; 3 — the first vaccination with attenuated *BP* bacteria; 4 — the repeated vaccination with attenuated *BP* bacteria; 5 — the infection with virulent *BP* bacteria 12 months after the vaccination with attenuated *BP* bacteria.

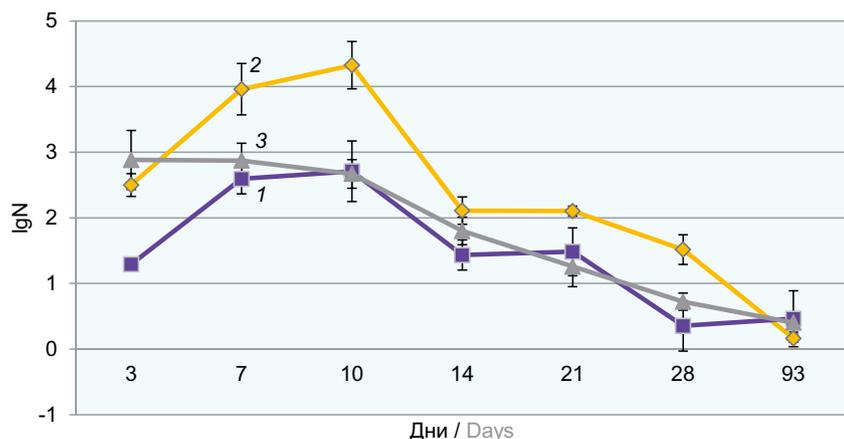


Рис. 2. Динамика изменения количества геном-эквивалентов бактерий *BP* 18323 после 1-й и 2-й экспериментальной интраназальной инфекции МР.

1 — 1-я экспериментальная интраназальная инфекция в дозе 10^7 КОЕ; 2 — 1-я экспериментальная интраназальная инфекция в дозе 10^9 КОЕ; 3 — повторная экспериментальная инфекция *BP* 18323 в дозе 10^9 – 10^{10} КОЕ.

Fig. 2. Changes in the number of *BP* 18323 genome-equivalents after the 1st and 2nd experimental intranasal infection of RMs.

1 — the 1st experimental intranasal infection at a dose of 10^7 CFU; 2 — the 1st experimental intranasal infection at a dose of 10^9 CFU; 3 — repeated experimental infection with *BP* 18323 at a dose of 10^9 – 10^{10} CFU.

Повторную инокуляцию аттенуированных бактерий *BP* проводили через 6 мес после 1-го введения, а экспериментальную инфекцию вирулентными бактериями *BP* — через 12 мес после реиммунизации.

Для прояснения зависимости картины элиминации от штамма бактерий и инфицирующей дозы проведено заражение половозрелых МР двумя дозами (10^7 КОЕ и 10^9 – 10^{10} КОЕ) вирулентных бактерий *BP* 18323. Каждой из доз интраназально инфицировали по 3 МР. Повторно всех МР инфицировали одной дозой 10^9 – 10^{10} бактерий. Повторную экспериментальную инфекцию вирулентными *BP* 475 или *BP* 18323 проводили через 4–6 мес после 1-й инокуляции. На рис. 1 и 2 видно, что число бактерий в носоглотке МР достигает максимума через 7–14 дней после экспериментальной инфекции аттенуированными бактериями *BP* 4MKS ($t_{max} = 7$ –14 дней), через 14–21 день после инфекции изогенными вирулентными бактериями *BP* 475 и через 7–10 дней после интраназальной инокуляции вирулентных бактерий *BP* 18323.

При посеве и ПЦР-анализе смывов назофарингеальных тампонов контрольных животных роста колоний и регистрации ДНК возбудителя коклюша не наблюдали.

Титр специфических IgG в сыворотке крови вакцинированных обезьян МР после интраназального инфицирования *BP*

Все эксперименты, описанные в предыдущем разделе, сопровождались изучением динамики изменения уровня специфических IgG к *BP* в сыворотке крови инфицированных животных. При 1-й экспериментальной инфекции количество специфических IgG в сыворотке крови животных нарастало (рис. 3, 4) начиная с 10–14-го дня и достигало максимума к 28-му дню у обезьян, инфицированных вирулентными и аттенуированными бактериями *BP* 475, и к 35–48-му дню после инфекции *BP* 18323. После повторной инфекции бактериями *BP* 18323 IgG достигал максимального значения к 14-му дню после инокуляции бактерий любого штамма.

Обсуждение

Доклинические исследования острой токсичности на крысах и мышатах, лейкоцитоз- и гистаминсенсibiliзирующей активности коклюшного токсина и весовой токсичности суспензии аттенуированных бактерий *BP* в классических экспериментах на линейных мышах, активности дермонекротического эндотоксина и гипоаллергенности

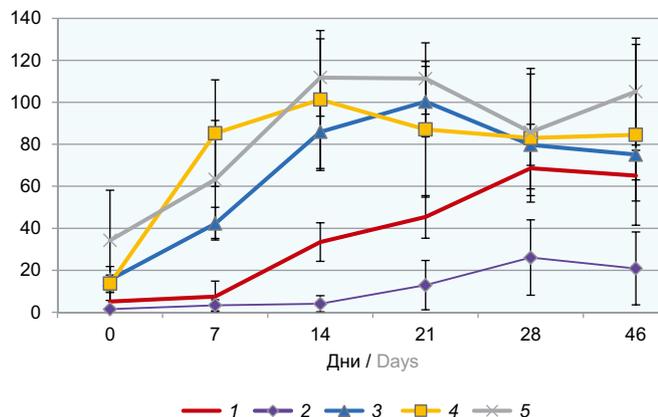


Рис. 3. Динамика изменения количества IgG в сыворотке крови МР после 1-го и повторного интраназального введения им бактерий *BP*.

По оси ординат — относительное значение количества IgG (в %): OD_{C_+}/OD_I , где OD_{C_+} — значение оптической плотности положительного контроля, OD_I — оптическая плотность в лунке с исследуемой сывороткой.

1 — 1-е введение аттенуированных бактерий *BP*; 2 — 1-е введение вирулентных бактерий *BP*; 3 — инфицирование вирулентными бактериями *BP* через 12 мес после введения аттенуированных бактерий *BP*; 4 — повторное введение вирулентных бактерий *BP*; 5 — повторное введение аттенуированных бактерий *BP*.

Fig. 3. Changes in the IgG level in the RMs' blood serum after the 1st and repeated intranasal vaccination with *BP* bacteria.

On the vertical axis — the relative value of IgG levels (%): OD_{C_+}/OD_I , where OD_{C_+} — optical density of the positive control, OD_I — optical density in the well with the studied serum.

1 — the 1st vaccination with attenuated *BP* bacteria; 2 — the 1st vaccination with virulent *BP* bacteria; 3 — the infection with virulent *BP* bacteria 12 months after the vaccination with attenuated *BP* bacteria; 4 — the repeated vaccination with virulent *BP* bacteria; 5 — the repeated vaccination with attenuated *BP* bacteria.

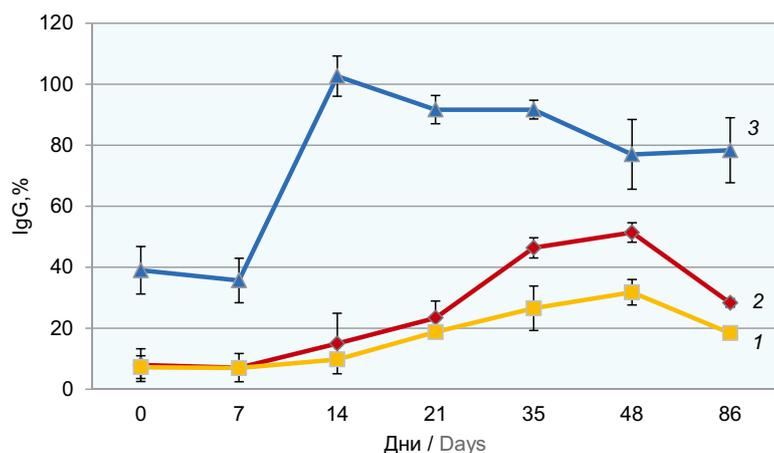


Рис. 4. Динамика изменения относительного количества IgG в сыворотке крови МР после 1-й и повторной интраназальной инфекции животных бактериями *BP* 18323.

1 — 1-я экспериментальная интраназальная инфекция в дозе 10^7 КОЕ; 2 — 1-я экспериментальная интраназальная инфекция в дозе 10^9 КОЕ; 3 — повторная экспериментальная инфекция *BP* 18323 в дозе 10^9 КОЕ.

Fig. 4. Changes in the IgG relative levels in the RMs' blood serum after the 1st and repeated intranasal infection of the animals with *BP* 18323 bacteria.

1 — the 1st experimental intranasal infection at a dose of 10^7 CFU; 2 — the 1st experimental intranasal infection at a dose of 10^9 CFU; 3 — the repeated experimental infection with *BP* 18323 at a dose of 10^9 CFU.

в экспериментах на кроликах и морских свинках продемонстрировали безопасность интраназального применения сконструированной нами живой рекомбинантной коклюшной вакцины (ЖКВ) [18].

Исследования, проведенные нами на половозрелых нечеловекообразных приматах, показали, что экспериментальная интраназальная инфекция обезьян вирулентными бактериями *BP* приводит к развитию лабораторных признаков коклюшной инфекции у обезьян МР, павиан гамадрил, макак яванский и макак японский [22]. У неполовозрелых павианов анубисов развивался характерный для коклюша кашель [19]. Иммунизация павианов анубис ЖКВ на основе аттенуированных бактерий *BP* BPZE1 продемонстрировала ее безопасность и иммуногенность [21]. Эти результаты указывали на перспективность экспериментальной модели нечеловекообразных обезьян для изучения иммунологических характеристик возбудителя коклюша и иммуногенности коклюшных вакцин.

Представленные в настоящем исследовании результаты продемонстрировали отсутствие изменения показателей анализа крови и местных реакций у МР после интраназальной инокуляции аттенуированных бактерий *BP* в полном соответствии с экспериментами на мелких лабораторных животных. После первой и повторной вакцинации не зарегистрировано воспалительных процессов в носоглотке животных, наблюдаемых нами после экспериментальной инфекции вирулентными бактериями. Не отмечено увеличения количества общих IgE в сыворотке крови обезьян после вакцинации и ревакцинации. У всех иммунизированных животных регистрировалось снижение IgE после заражения вирулентными бактериями *BP* 475. Эти наблюдения хорошо согласуются с результатами R. Li с соавт. [26], показавших, что интраназальная вакцинация мышей аттенуированными бактериями *BP* BPZE1 не только не вызывает аллергических реакций, но и защищает животных от экспериментального аллергического воспаления и снижает уровень IgE в сыворотке крови.

Следует отметить, что тест-система «IgE Ridascreen», предназначенная для работы с сыворотками крови человека, не выявляла IgE в сыворотке обезьян. Для регистрации IgE в сыворотке крови обезьян была использована тест-система «IgE Вектор-Бест». Эта система не применялась ранее для оценки IgE обезьян, поэтому полученные цифры не могут быть использованы для количественного определения, но пригодны для качественной оценки изменения содержания IgE после иммунизации животных.

Размножение вирулентных бактерий *BP* в носоглотке и их персистенция в организме человека являются важными характеристиками коклюшной инфекции. Согласно имеющимся в настоящее время данным иммунизация обезьян ЦКВ и аттенуированными бактериями, в отличие от БКВ, приводит к формированию мукозального иммунитета, препятствующего размножению вирулентных бактерий *BP* при их проникновении в организм человека и обезьяны. Представленные на рис. 1 и 2 графики демонстрируют схожую динамику размножения/эрадикации аттенуированных и вирулентных бактерий разных штаммов в рото-носоглотке МР. Отдельные геном-эквиваленты *BP* регистрируются в назофарингеальных изолятах с помощью ПЦР в реальном времени вплоть до 6 мес. Аналогичные результаты получены нами при обследовании выздоравливающих от коклюша детей разного возраста, у 15–20% которых возбудитель коклюша регистрировали с помощью ПЦР в реальном времени спустя 6 мес после постановки диагноза [27].

Схожая картина наблюдалась после повторной инокуляции аттенуированных и вирулентных бактерий обезьянам и после экспериментальной инфекции иммунизированных животных вирулентными бактериями. Кривые размножения/эрадикации после повторной инокуляции бактерий (рис. 1 и 2) не имеют качественных отличий, но принципиально отличаются от картины после 1-й инокуляции отсутствием накопления и значительно более быстрой эрадикацией бактерий. Например, к 28-му дню после повторной инфекции (иммунизации) бактерии не выявлялись или их удавалось зарегистрировать только в единичных копиях, тогда как в эти же сроки после 1-й инфекции число геном-эквивалентов бактерий *BP* могло составлять несколько десятков. Необходимо отметить, что чувствительность использованной нами тест-системы составляет 0,01–0,1 геном-эквивалента в 5 мкл раствора и определяется применением многокопийной последовательности *IS481* в качестве мишени амплификации [24, 25].

Для изучения зависимости динамики размножения бактерий и развития иммунного ответа от инфицирующей дозы и штамма бактерий наряду с изогенными вирулентными и аттенуированными

бактериями *BP* 475 и 4МКС использованы вирулентные бактерии *BP* 18323, применяемые для определения защитной активности ЦКВ. Бактерии вводили 3 МР по 10^9 – 10^{10} КОЕ, 3 МР — по 10^7 КОЕ. Количество бактерий и динамика размножения/эрадикации после экспериментальной инфекции МР, получивших 10^9 бактерий, не имели статистически значимых отличий от динамики при инфицировании животных другими штаммами *BP*. Измеренные нами значения t_{max} для *BP* 475, 18323 и 4МКС близки друг к другу и совпадают со значениями, приведенными в работе J.M. Warfel и соавт. [19] для бактерий *BP* D420, полученных при инфицировании детенышей павиана анубиса.

При инфицировании обезьян дозой 10^7 КОЕ бактерий *BP* на протяжении всего времени развития 1-й инфекции наблюдали достоверно меньшее количество геном-эквивалентов бактерий *BP* в носоглотке животных (рис. 2). Это обстоятельство было учтено нами при определении вакцинирующей дозы для клинических исследований ЖКВ на здоровых добровольцах, продолжающихся в настоящее время.

Следует отметить, что проведенные нами ранее исследования показали, что в процессе персистенции бактерий *BP* в организме обезьяны происходит изменение фазового состава популяции. Если в первые часы после инфекции подавляющее большинство бактерий *BP* находятся в вирулентном состоянии, характеризующемся нативной структурой оперона *bvgAS*, то в процессе развития инфекции гетерогенность популяции бактерий *BP* возрастает за счет увеличения доли авирулентных мутантов возбудителя коклюша, несущих инсерцию *IS481* в опероне *bvgAS* *BP*. В наибольшей степени процесс выражен после повторных инокуляций, когда количество инсерционных мутантов бактерий *BP* в персистирующей популяции может достигать 50% от числа зарегистрированных бактерий [28]. Это наблюдение указывает на возможный механизм формирования длительно персистирующих бактерий, обеспечивающих выживание патогена и его передачу новому хозяину.

На рис. 3 и 4 видно, что динамика изменения титра специфических IgG в сыворотке крови вакцинированных обезьян, экспериментально инфицированных вирулентными бактериями *BP*, близка к соответствующей кривой, полученной после повторного инфицирования МР, и значительно отличается от динамики IgG после 1-й экспериментальной инфекции вирулентными и аттенуированными бактериями. У всех реиммунизированных и инфицированных после иммунизации вирулентными бактериями *BP* животных количество антител быстро нарастало и достигало максимума к 10–14-му дню. Эти результаты полностью соответствуют результатам определения IgG после повторного заражения

вирулентными бактериями *BP 475* и хорошо согласуются с приведенными выше результатами изучения динамики накопления бактерий в носоглотке инфицированных животных. Быстрое нарастание специфических антител после повторного контакта с инфекцией способствует подавлению размножения бактерий и их элиминации из носоглотки животных.

Схожая динамика выявлена нами при 2- и 3-кратных экспериментальных заражениях разных видов обезьян Старого Света вирулентными бактериями *BP*, в том числе в дозах 10^{10} – 10^{11} КОЕ. Во всех случаях зарегистрированы выраженный бустер гуморального иммунного ответа и ускоренная элиминация возбудителя после повторного заражения [22]. Наличие бустерного эффекта повторной вакцинации при низких значениях и даже при отсутствии IgG у некоторых животных после 1-й вакцинации, а также ускоренная элиминация бактерий у всех животных после повторной вакцинации указывают на то, что даже однократная интраназальная вакцинация аттенуированными бактериями может оказаться достаточной для обеспечения защиты от экспериментальной инфекции.

Таким образом, экспериментальная интраназальная инфекция МР аттенуированными и вирулентными бактериями *BP* приводит к формированию защитной реакции организма, проявляющейся в подавлении размножения бактерий, ускорении темпов их элиминации из носоглотки животных и развитии гуморального иммунного ответа. Развитие гуморального, антительного ответа после повторной инфекции носит бустерный характер, независимо от штамма бактерий. Представленные результаты указывают на общие механизмы формирования поствакцинального иммунитета после интраназальной иммунизации животных ЖКВ и постинфекционного противокклюшного иммунитета, обеспечивающих защиту от повторного инфицирования бактериями *BP* и развития клинических симптомов коклюша. Представленные данные не противоречат результатам С. Lochт и соавт. [21], продемонстрировавшим наличие выраженного защитного эффекта в отношении экспериментальной инфекции вирулентными бактериями *BP D420* у павианов анубисов, иммунизированных живыми аттенуированными бактериями *BP*. Менее выраженным защитным эффектом обладают инактивированные бактерии возбудителя (ЦКВ), в то время как БКВ не обеспечивала защиты от размножения бактерий после повторной инфекции [20, 21].

Отсутствие специфических для обезьян тест-систем иммуноферментного анализа (ИФА) значительно осложняет регистрацию коклюшных антител у этих животных. Если использованная нами тест-система ИФА IgG человека «Ridascreen» оказалась пригодной для регистрации IgG у МР, павиа-

нов гамадрилов, макак яванских и макак японских, то тест-система той же фирмы для IgA человека была совершенно не чувствительна к IgA обезьян. Нам удалось определить значения IgM на разных сроках экспериментальной коклюшной инфекции обезьян с помощью тест-системы ИФА IgM человека *BP* «Ridascreen», однако низкие абсолютные значения величин и большой разброс делают непродуктивным их обсуждение. Скорее всего, наблюдаемая картина объясняется недостаточной эффективностью коммерческой тест-системы на сыворотке обезьян. Полученные результаты указывают на необходимость конструирования тест-систем ИФА, специфичных для иммуноглобулинов нечеловекообразных обезьян, в процессе дальнейшего использования этих животных в качестве экспериментальной модели.

Заключение

Интраназальная однократная и повторная инокуляции аттенуированных бактерий *BP* не вызывали воспалительных процессов в носоглотке МР и изменения лабораторных показателей крови, наблюдаемых после экспериментальной инфекции нечеловекообразных приматов вирулентными бактериями.

Не зарегистрировано повышения уровня общего IgE в сыворотке крови обезьян после и однократной и двукратной иммунизации.

Экспериментальная интраназальная инфекция МР аттенуированными и вирулентными бактериями *BP* приводит к формированию защитной реакции организма, проявляющейся в подавлении размножения бактерий, ускорении темпов их элиминации из носоглотки животных и развитии гуморального иммунного ответа. Развитие гуморального, антительного ответа после повторной инфекции носит бустерный характер, независимо от штамма бактерий.

Представленные результаты указывают на общие механизмы формирования поствакцинального иммунитета после интраназальной вакцинации животных и постинфекционного противокклюшного иммунитета, обеспечивающих защиту от повторного инфицирования бактериями *BP* и развития клинических симптомов коклюша.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pertussis vaccines: WHO position paper – September 2015. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 2015; 90(35): 433-60.
2. Wood N., McIntyre P. Pertussis: review of epidemiology, diagnosis, management and prevention. *Paediatr. Respir. Rev.* 2008; 9(3): 201-11. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.prrv.2008.05.010>
3. Wilely K.E., Zuo Y., Macartney K.K., McIntyre P. Sources of pertussis infection in young infants: a review of key evidence informing targeting of the cocoon strategy. *Vaccine.* 2013; 31(4): 618-25. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.11.052>
4. Pinto M.V., Merkel T.J. Pertussis disease and transmission and host responses: insights from the baboon model of pertussis. *J. Infect.* 2017; 74(Suppl. 1): S114-9. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0163-4453\(17\)30201-3](http://doi.org/10.1016/S0163-4453(17)30201-3)

5. Медкова А.Ю., Аляпкина Ю.С., Сияяшина Л.Н., Амелина И.П., Алексеев Я.И., Каратаев Г.И. и др. Распространенность стрептококков и анализ фазовых состояний бактерий *Bordetella pertussis*. *Детские инфекции*. 2010; 9(4): 19-22.
6. CDC. Pertussis epidemic – Washington, 2012. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2012; 61(28): 517-22.
7. Rosewell A., Spokes P., Gilmour R.E. NSW Annual vaccine-preventable disease report, 2011. *NSW Public Health Bull.* 2012; 23(9-10): 171-8. DOI: <http://doi.org/10.1071/NB12086>
8. Gonfiantini M.V., Carloni E., Gesualdo F., Pandolfi E., Agricola E., Rizzuto E., et al. Epidemiology of pertussis in Italy: disease trends over the last century. *Euro Surveill.* 2014; 19(40): 20921. DOI: <http://doi.org/10.2807/1560-7917.es2014.19.40.20921>
9. Health Protection report. Confirmed pertussis in England and Wales: data to end – November 2012. Available at: <http://webarchive.nationalarchives.gov.uk/20140505162355/http://www.hpa.org.uk/hpr/archives/2012/news5112.htm>
10. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Инфекционная заболеваемость в Российской Федерации за январь–октябрь 2018 г. М.; 2018.
11. Лобзин Ю.В., Харит С.М. Проблемы вакцинопрофилактики: краткая история, современное состояние и пути решения. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2014; (6): 30-7.
12. Warfel J.M., Zimmerman L.I., Merkel T.J. Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014; 111(2): 787-92. DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.1314688110>
13. Kilgore P.E., Salim A.M., Zervos M.J., Schmitt H.J. Pertussis: microbiology, disease, treatment, and prevention. *Clin. Microbiol. Rev.* 2016; 29(3): 449-86. DOI: <http://doi.org/10.1128/CMR.00083-15>
14. Chen Z., He Q. Immune persistence after pertussis vaccination. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2017; 13(4): 744-56. DOI: <http://doi.org/10.1080/21645515.2016.1259780>
15. Guiso N., Njamkepo E., Vié le Sage F., Zepp F., Meyer C.U., Abitbol V., et al. Long-term humoral and cell-mediated immunity after acellular pertussis vaccination compares favourably with whole-cell vaccines 6 years after booster vaccination in the second year of life. *Vaccine.* 2007; 25(8): 1390-7. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.10.048>
16. Amirthalingam G., Andrews N., Campbell H., Ribeiro S., Kara E., Donegan K., et al. Effectiveness of maternal pertussis vaccination in England: an observational study. *Lancet.* 2014; 384(9953): 1521-8. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60686-3](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60686-3)
17. Семин Е.Г., Сияяшина Л.Н., Медкова А.Ю. и др. Конструирование рекомбинантных аттенуированных бактерий *Bordetella pertussis* генотипа *ptxP3*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2018; (4): 33-41. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-4-33-4118>
18. Сияяшина Л.Н., Семин Е.Г., Медкова А.Ю., Сюдюкова Р.А., Каратаев Г.И. Доклиническое исследование токсичности и безопасности кандидатной живой коклюшной вакцины интраназального применения. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2018; 17(6): 98-108. DOI: <http://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-98-108>
19. Warfel J.M., Beren J., Kelly V.K., Lee G., Merkel T.J. Nonhuman primate model of pertussis. *Infect. Immun.* 2012; 80(4): 1530-6. DOI: <http://doi.org/10.1128/IAI.06310-11>
20. Warfel J.M., Zimmerman L.I., Merkel T.J. Comparison of three whole-cell pertussis vaccines in the baboon model of pertussis. *Clin. Vaccine Immunol.* 2015; 23(1): 47-54. DOI: <http://doi.org/10.1128/CI.00449-15>
21. Loch C., Papin J.F., Lecher S., Debrie A.S., Thalen M., Solovay K., et al. Live attenuated pertussis vaccine BPZE1 protects baboons against *B. pertussis*. *J. Infect. Dis.* 2017; 216(1): 117-24. DOI: <http://doi.org/10.1093/infdis/jix254>
22. Кубрава Д.Т., Медкова А.Ю., Сияяшина Л.Н., Шевцова З.В., Матуа А.З., Конджария И.Г. и др. Экспериментальный коклюш у обезьян. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2013; 68(8): 28-33.
23. Медкова А.Ю., Каратаев Г.И., Шевцова З.В., Матуа А.З., Семин Е.Г., Амичба А.А. и др. Эпизоотический очаг коклюша у обезьян вида *Papio gamadryas*. *Журнал инфектологии*. 2015; 7(3): 103-11. DOI: <http://doi.org/10.22625/2072-6732-2015-7-3-103-111>
24. Медкова А.Ю., Аляпкина Ю.С., Сияяшина Л.Н., Амелина И.П., Алексеев Я.И., Боковой Я.И. и др. Выявление инсерционных мутантов авирулентных bvg-мутантов *Bordetella pertussis* у больных коклюшем, острой респираторной вирусной инфекцией и практически здоровых людей. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2010; (4): 27-31.
25. Bidet P., Liguori S., De Lauzanne A., Caro V., Lorrot M., Carol A., et al. Real-time PCR measurement of persistence of *Bordetella pertussis* DNA in nasopharyngeal secretions during antibiotic treatment of young children with pertussis. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46(11): 3636-8. DOI: <http://doi.org/10.1128/JCM.01308-08>
26. Li R., Cheng C., Chong S.Z., Lim A.R., Goh Y.F., Loch C., et al. Attenuated *Bordetella pertussis* BPZE1 protects against allergic airway inflammation and contact dermatitis in mouse models. *Allergy.* 2012; 67(10): 1250-8. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2012.02884.x>
27. Нестерова Ю.В., Медкова А.Ю., Бабаченко И.В., Семин Е.Г., Калиникова Е.Л., Сияяшина Л.Н. и др. Клинико-диагностическое значение генетических маркеров *Bordetella pertussis* у контактных лиц в семейных очагах. *Журнал инфектологии*. 2019; 11(1): 17-24. DOI: <http://doi.org/10.22625/2072-6732-2019-11-1-17-24>
28. Каратаев Г.И., Сияяшина Л.Н., Медкова А.Ю., Семин Е.Г., Шевцова З.В., Матуа А.З. и др. Инсерционная инактивация оперона вирулентности в популяции персистирующих бактерий *Bordetella pertussis*. *Генетика*. 2016; 52(4): 422-30. DOI: <http://doi.org/10.7868/S0016675816030085>

REFERENCES

1. Pertussis vaccines: WHO position paper – September 2015. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 2015; 90(35): 433-60.
2. Wood N., McIntyre P. Pertussis: review of epidemiology, diagnosis, management and prevention. *Paediatr. Respir Rev.* 2008; 9(3): 201-11. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.prrv.2008.05.010>
3. Wiley K.E., Zuo Y., Macartney K.K., McIntyre P. Sources of pertussis infection in young infants: a review of key evidence informing targeting of the cocoon strategy. *Vaccine.* 2013; 31(4): 618-25. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.11.052>
4. Pinto M.V., Merkel T.J. Pertussis disease and transmission and host responses: insights from the baboon model of pertussis. *J. Infect.* 2017; 74(Suppl. 1): S114-9. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0163-4453\(17\)30201-3](http://doi.org/10.1016/S0163-4453(17)30201-3)
5. Medkova A.Yu., Alyapkina Yu.S., Sinyashina L.N., Amelina I.P., Alekseev Ya.I., Karataev G.I., et al. The prevalence of subclinical forms of pertussis and analysis of phase states of bacteria *Bordetella pertussis*. *Detskie infektologii*. 2010; 9(4): 19-22. (in Russian)
6. CDC. Pertussis epidemic – Washington, 2012. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2012; 61(28): 517-22.
7. Rosewell A., Spokes P., Gilmour R.E. NSW Annual vaccine-preventable disease report, 2011. *NSW Public Health Bull.* 2012; 23(9-10): 171-8. DOI: <http://doi.org/10.1071/NB12086>
8. Gonfiantini M.V., Carloni E., Gesualdo F., Pandolfi E., Agricola E., Rizzuto E., et al. Epidemiology of pertussis in Italy: disease trends over the last century. *Euro Surveill.* 2014; 19(40): 20921. DOI: <http://doi.org/10.2807/1560-7917.es2014.19.40.20921>
9. Health Protection report. Confirmed pertussis in England and Wales: data to end – November 2012. Available at: <http://webarchive.nationalarchives.gov.uk/20140505162355/http://www.hpa.org.uk/hpr/archives/2012/news5112.htm>
10. The Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing. Infectious diseases in the Russian Federation in January–October 2018. Moscow; 2018. (in Russian)
11. Lobzin Yu.V., Kharit S.M. The problem of vaccination: a brief history, state-of-the-art, and ways of solution. *Epidemiologiya i infektionnye bolezni. Aktual'nye voprosy*. 2014; (6): 30-7. (in Russian)
12. Warfel J.M., Zimmerman L.I., Merkel T.J. Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014; 111(2): 787-92. DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.1314688110>
13. Kilgore P.E., Salim A.M., Zervos M.J., Schmitt H.J. Pertussis: microbiology, disease, treatment, and prevention. *Clin. Microbiol. Rev.* 2016; 29(3): 449-86. DOI: <http://doi.org/10.1128/CMR.00083-15>
14. Chen Z., He Q. Immune persistence after pertussis vaccination.

- Hum. Vaccin. Immunother.* 2017; 13(4): 744-56.
DOI: <http://doi.org/10.1080/21645515.2016.1259780>
15. Guiso N., Njamkepo E., Vié le Sage F., Zepp F., Meyer C.U., Abitbol V., et al. Long-term humoral and cell-mediated immunity after acellular pertussis vaccination compares favourably with whole-cell vaccines 6 years after booster vaccination in the second year of life. *Vaccine.* 2007; 25(8): 1390-7.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.10.048>
 16. Amirthalingam G., Andrews N., Campbell H., Ribeiro S., Kara E., Donegan K., et al. Effectiveness of maternal pertussis vaccination in England: an observational study. *Lancet.* 2014; 384(9953): 1521-8. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60686-3](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60686-3)
 17. Semin E.G., Sinyashina L.N., Medkova A.Yu., Karataev G.I. Construction of recombinant attenuated *Bordetella pertussis* bacteria PtxP3. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2018; (4): 33-41.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-4-33-4118> (In Russ.)
 18. Sinyashina L.N., Semin E.G., Medkova A.Yu., Syundyukova R.A., Karataev G.I. Pre-clinical toxicity study and safety assessment of candidate live pertussis vaccine for intranasal administration. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika.* 2018; 17(6): 98-108.
DOI: <http://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-98-108> (in Russian)
 19. Warfel J.M., Beren J., Kelly V.K., Lee G., Merkel T.J. Nonhuman primate model of pertussis. *Infect. Immun.* 2012; 80(4): 1530-6. DOI: <http://doi.org/10.1128/IAI.06310-11>
 20. Warfel J.M., Zimmerman L.I., Merkel T.J. Comparison of three whole-cell pertussis vaccines in the baboon model of pertussis. *Clin. Vaccine Immunol.* 2015; 23(1): 47-54.
DOI: <http://doi.org/10.1128/CAI.00449-15>
 21. Loch C., Papin J.F., Lecher S., Debrie A.S., Thalen M., Solovay K., et al. Live attenuated pertussis vaccine BPZE1 protects baboons against *B. pertussis*. *J. Infect. Dis.* 2017; 216(1): 117-24.
DOI: <http://doi.org/10.1093/infdis/jix254>
 22. Kubrava D.T., Medkova A.Yu., Sinyashina L.N., Shevtsova Z.V., Matua A.Z., Kondzhariya I.G., et al. Experimental whooping cough of nonhuman primate. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk.* 2013; 68(8): 28-33. (in Russian)
 23. Medkova A.Yu., Karataev G.I., Shevtsova Z.V., Matua A.Z., Semin E.G., Amichba A.A., et al. Epizootic pertussis focus of hamadryad baboons. *Zhurnal infektologii.* 2015; 7(3): 103-11.
DOI: <http://doi.org/10.22625/2072-6732-2015-7-3-103-111> (in Russian)
 24. Medkova A.Yu., Alyapkina Yu.S., Sinyashina L.N., Amelina I.P., Alekseev G.I., Bokovoy Ya.I., et al. Detection of avirulent insertional *Bordetella pertussis* bvg-mutants in patients with pertussis and with upper respiratory tract infection and in seemingly healthy people. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya.* 2010; (4): 27-31. (in Russian)
 25. Bidet P., Liguori S., De Lauzanne A., Caro V., Lorrot M., Carol A., et al. Real-time PCR measurement of persistence of *Bordetella pertussis* DNA in nasopharyngeal secretions during antibiotic treatment of young children with pertussis. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46(11): 3636-8. DOI: <http://doi.org/10.1128/JCM.01308-08>
 26. Li R., Cheng C., Chong S.Z., Lim A.R., Goh Y.F., Loch C., et al. Attenuated *Bordetella pertussis* BPZE1 protects against allergic airway inflammation and contact dermatitis in mouse models. *Allergy.* 2012; 67(10): 1250-8.
DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2012.02884.x>
 27. Nesterova Yu.V., Medkova A.Yu., Babachenko I.V., Semin E.G., Kalisnikova E.L., Sinyashina L.N., et al. Clinical-diagnostic value of *Bordetella pertussis* genetic markers in contact persons in familial foci. *Zhurnal infektologii.* 2019; 11(1): 17-24.
DOI: <http://doi.org/10.22625/2072-6732-2019-11-1-17-24> (in Russian)
 28. Karataev G.I., Sinyashina L.N., Medkova A.Yu., Semin E.G., Shevtsova Z.V., Matua A.Z., et al. Insertional inactivation of virulence operon in population of persistent *Bordetella pertussis* bacteria. *Genetika.* 2016; 52(4): 422-30.
DOI: <http://doi.org/10.7868/S0016675816030085> (in Russian)

Информация об авторах:

Медкова Алиса Юрьевна — к.м.н., с.н.с. лаб. генетики бактерий ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, 123098, Москва, Россия; зав. инфекционным детским отделением ФГБУ «ЦКБ с поликлиникой» УД Президента РФ, 121359, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0729-6516>.

Синяшина Людмила Николаевна — д.м.н., в.н.с. лаб. генетики бактерий ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, 123098, Москва, Россия.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0003-1708-5453>.

Амишба Астанда Арнольдовна — м.н.с. лаб. иммунологии и вирусологии НИИ экспериментальной патологии и терапии АН Абхазии, 384900, Сухум, Абхазия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4986-1392>.

Семин Евгений Григорьевич — н.с. лаб. генетики бактерий ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, 123098, Москва, Россия.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-6696-8362>.

Шевцова Зинаида Всеволодовна — д.м.н., г.н.с. лаб. вирусологии и иммунологии НИИ экспериментальной патологии и терапии АН Абхазии, 384900, Сухум, Абхазия; проф. каф. экспериментальной биологии и медицины Абхазского государственного университета, 384904, Сухум, Абхазия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6471-1608>.

Матиа Алиса Зауровна — к.б.н., зам. директора по научной работе, зав. лаб. иммунологии и вирусологии НИИ экспериментальной патологии и терапии АН Абхазии, 384900, Сухум, Абхазия; доц. каф. экспериментальной биологии и медицины Абхазского государственного университета, 384904, Сухум, Абхазия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3275-0941>.

Джидарян Ануш Ашотовна — ст. лаборант лаб. иммунологии и вирусологии НИИ экспериментальной патологии и терапии АН Абхазии, 384900, Сухум, Абхазия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8792-5289>.

Кубрава Джени Тамазовна — м.н.с. лаб. иммунологии и вирусологии НИИ экспериментальной патологии и терапии АН

Information about the authors:

Alisa Yu. Medkova — senior researcher, Laboratory of genetics of bacteria, Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, 123098, Moscow, Russia; Head, Department of paediatric infectious diseases, Central Clinical Hospital with a Polyclinic, Office of the President of the Russian Federation, 121359, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0729-6516>.

Lyudmila N. Sinyashina — leading researcher, Laboratory of genetics of bacteria, Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, 123098, Moscow, Russia.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0003-1708-5453>.

Astana A. Amichba — junior researcher, Laboratory of virology and immunology, Research Institute of Experimental Pathology and Therapy of the Academy of Sciences of Abkhazia, 384900, Sukhumi, Abkhazia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4986-1392>.

Evgeniy G. Semin — researcher, Laboratory of genetics of bacteria, Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, 123098, Moscow, Russia.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0003-1708-5453>.

Zinaida V. Shevtsova — D. Sci. (Med.), chief researcher, Laboratory of virology and immunology, Research Institute of Experimental Pathology and Therapy of the Academy of Sciences of Abkhazia, 384900, Sukhumi, Abkhazia; Prof., Department of experimental biology and medicine, Abkhazian State University, 394904, Sukhumi, Abkhazia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6471-1608>.

Alisa Z. Matua — PhD (Biol.), Deputy Director for science, Head, Laboratory of immunology and virology, Research Institute of Experimental Pathology and Therapy of the Academy of Sciences of Abkhazia, 384900, Sukhumi, Abkhazia; Assoc. Prof., Department of experimental biology and medicine, Abkhazian State University, 394904, Sukhumi, Abkhazia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3275-0941>.

Абхазии, 384900, Сухум, Абхазия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9104-4014>.

Конджария Ирина Георгиевна — к.б.н., с.н.с. лаб. иммунологии и вирусологии НИИ экспериментальной патологии и терапии АН Абхазии, 384900, Сухум, Абхазия; доц. каф. экспериментальной биологии и медицины Абхазского государственного университета, 384904, Сухум, Абхазия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3707-4874>.

Миквабия Зураб Ясонович — д.м.н., проф., директор НИИ экспериментальной патологии и терапии АН Абхазии, 384900, Сухум, Абхазия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0729-6516>.

Каратаев Геннадий Иванович[✉] — д.б.н., в.н.с., рук. лаб. генетики бактерий ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, 123098, Москва, Россия.

ORCID ID <http://orcid.org/0000-0001-8771-6092>.

E-mail: karataevgi@rambler.ru

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

Anush A. Djidaryan — senior laboratory assistant, Laboratory of virology and immunology, Research Institute of Experimental Pathology and Therapy of the Academy of Sciences of Abkhazia, 384900, Sukhumi, Abkhazia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8792-5289>.

Dzhenni T. Kubrava — junior researcher, Laboratory of virology and immunology, Research Institute of Experimental Pathology and Therapy of the Academy of Sciences of Abkhazia, 384900, Sukhumi, Abkhazia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9104-4014>.

Irina G. Kondzhariya — PhD (Biol.), senior researcher, Laboratory of virology and immunology, Research Institute of Experimental Pathology and Therapy of the Academy of Sciences of Abkhazia, 384900, Sukhumi, Abkhazia; Assoc. Prof., Department of experimental biology and medicine, Abkhazian State University, 394904, Sukhumi, Abkhazia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3707-4874>.

Zurab Ya. Mikvabiya — D. Sci. (Med.), Prof., director, Research Institute of Experimental Pathology and Therapy of the Academy of Sciences of Abkhazia, 384900, Sukhumi, Abkhazia;

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0729-6516>.

Gennadiy I. Karataev[✉] — D. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of genetics of bacteria, Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, 123098, Moscow, Russia.

ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-8771-6092>.

E-mail: karataevgi@rambler.ru

Contribution: the authors contributed equally to this article.



Молекулярно-эпидемиологические особенности циркуляции энтеровируса Коксаки А10 в Дальневосточном федеральном округе

Бутакова Л.В. , Сапега Е.Ю., Троценко О.Е.

ФБУН «Хабаровский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора, 680610, Хабаровск, Россия

Актуальность. В Дальневосточном федеральном округе (ДФО) ежегодно наблюдаются подъемы заболеваемости энтеровирусной инфекцией. При этом отмечается широкое разнообразие циркулирующих непوليوмиелитных энтеровирусов. Среди них можно выделить те, которые на протяжении ряда лет постоянно идентифицируют у населения ДФО, в том числе вирус Коксаки А10.

Цель. Изучить особенности циркуляции энтеровируса Коксаки А10 на территории ДФО в 2014–2018 гг.

Материалы и методы. Для работы были использованы 117 полных нуклеотидных последовательностей гена VP1 энтеровируса Коксаки А10, которые были выделены в ДФО в 2014–2018 гг.

Результаты. По результатам филогенетического анализа выявлены две генетические линии Коксаки А10, при этом в Сахалинской области в 2017 г. отмечена их одновременная циркуляция. Активная миграция населения способствует широкому распространению Коксаки А10 на сопредельных территориях с формированием эпидемических вариантов.

Заключение. Энтеровирус Коксаки А10 является одним из наиболее актуальных типов непوليوмиелитных энтеровирусов для ДФО. Проведенный филогенетический анализ позволил выявить его генетическое разнообразие и предположить как европейское, так и азиатское происхождение полученных штаммов.

Ключевые слова: энтеровирус; Коксаки А10; кластер; филогенетический анализ.

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: Бутакова Л.В., Сапега Е.Ю., Троценко О.Е. Молекулярно-эпидемиологические особенности циркуляции энтеровируса Коксаки А10 в Дальневосточном федеральном округе.

Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2020; 97(4): 324–330.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-4>

Поступила 05.12.2019

Принята в печать 31.05.2020

Molecular epidemiological features of the Coxsackievirus A10 circulation in the Far Eastern Federal District of Russia

Lyudmila V. Butakova , Elena Yu. Sapega, Olga E. Trotsenko

Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 680610, Khabarovsk, Russia

Background. Increase in incidence rates of enterovirus infections in the Far Eastern Federal District of Russia is observed annually. There is a wide genetic diversity of circulating non-polio enteroviruses. Some of them have been constantly identified for a number of years in the population of the district, including the Coxsackie A10 virus.

Purpose. To study the features of the Coxsackievirus A10 circulation in the Far Eastern Federal District of Russia in 2014–2018.

Methods. For this work, 117 Coxsackievirus A10 complete sequences of the VP1 gene were used, which were isolated in the Far Eastern Federal District of Russia in 2014–2018.

Results. Phylogenetic analysis revealed two Coxsackievirus A10 lineages in the Far Eastern Federal District of Russia in 2014–2018, while their simultaneous circulation was noted in the Sakhalin region in 2017. Active population migration contributes to the widespread distribution of Coxsackievirus A10 in border areas with the formation of epidemic variants.

Conclusion. Coxsackievirus A10 is one of the most relevant types of non-polio enteroviruses for the Far Eastern Federal District of Russia. Phylogenetic analysis revealed its genetic diversity and suggested both European and Asian origin of the obtained strains.

Keywords: *enterovirus; Coxsackievirus A10; cluster; phylogenetic analysis.*

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: Butakova L.V., Sapega E.Yu., Trotsenko O.E. [Molecular epidemiological features of the Coxsackievirus A10 circulation in the Far Eastern Federal District of Russia]. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii.* 2020; 97(4): 324–330. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-4>

Received 5 December 2019

Accepted 31 May 2020

Введение

Актуальность энтеровирусной инфекции (ЭВИ) для населения России обусловлена возникновением на ее территории ежегодных сезонных подъемов заболеваемости с формированием вспышечных очагов. ЭВИ имеет многочисленные клинические проявления и поражает различные возрастные группы. Учитывая, что в большинстве случаев ЭВИ протекает при отсутствии ярко выраженных специфических признаков, имеется высокая вероятность неправильного или/и несвоевременного установления диагноза. В свою очередь это является одной из причин быстрого распространения инфекции и приводит к возникновению очагов заболеваемости.

Энтеровирусы (ЭВ) входят в состав крупного семейства *Picornaviridae* и представляют собой мелкие безоболочечные вирусы с геномом в виде одноцепочечной положительно заряженной РНК. ЭВ, вызывающие заболевания у человека, образуют 4 вида: А, В, С и D [1].

ЭВ Коксаки А10 является одним из наиболее часто выявляемых типов ЭВ и впервые был выделен Г. Далдорфом и сотр. в США в 1950 г. от больного серозным менингитом [2]. Кроме того, Коксаки А10 идентифицируют у пациентов с герпангиной, респираторной формой ЭВИ, экзантемой полости рта и конечностей (HFMD — hand, foot and mouth disease), плевродинией [3]. Несмотря на то что для большинства случаев ЭВИ, обусловленных Коксаки А10, характерно благоприятное течение, в некоторых случаях могут наблюдаться тяжелые неврологические и кардиопульмональные осложнения [4], а также летальные исходы у новорожденных [5].

В последнее десятилетие ЭВ Коксаки А10, наряду с ЭВ Коксаки А6, стал чаще выявляться при вспышках HFMD, которые ранее в основном вызывали ЭВ А71 и Коксаки А16 [6]. Так, имеются публикации об участии Коксаки А10 в возникновении эпидемической заболеваемости HFMD в Финляндии в 2008 г. [7], Испании в 2008 г. [8], Сингапуре в 2008 г. [9], Франции в 2010 г. [10], Китае в 2012–2013 гг. [11].

Цель настоящей работы — изучить особенности циркуляции ЭВ Коксаки А10 на территории

Дальневосточного федерального округа (ДФО) в 2014–2018 гг.

Материалы и методы

Для анализа регистрируемой заболеваемости ЭВИ в ДФО использованы статистические данные государственных форм отчетности № 1 и 2 «Сведения об инфекционной и паразитарной заболеваемости», № 23-09 «Сведения о вспышках инфекционных заболеваний», отчеты Дальневосточного регионального научно-методического центра по изучению энтеровирусных инфекций (ФБУН «Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора).

Биологический материал от лиц с подозрением на ЭВИ, поступавший из субъектов ДФО в 2014–2018 гг., был исследован молекулярно-генетическими методами. Тип ЭВ в положительных образцах устанавливали с помощью секвенирования фрагментов областей генома VP1 (≈370 нуклеотидных оснований (н.о.)) и VP2 (≈368 н.о.) с последующим сравнением полученных нуклеотидных последовательностей с референсными, представленными в GenBank.

В настоящем исследовании дополнительно получены полные нуклеотидные последовательности гена *VP1* (длина = 894 н.о.) штаммов ЭВ Коксаки А10, необходимые для проведения более оптимального филогенетического анализа. В качестве референсных из GenBank были взяты 800 нуклеотидных последовательностей, представляющих полный участок *VP1* (894 н.о.) и полный геном Коксаки А10 (≈7400 н.о.). После выравнивания всех референсных последовательностей некачественные сиквенсы были удалены (с наличием гэпов, неопределенных нуклеотидов), остальные подвергнуты анализу с целью выявления сходных друг с другом на 1–3%, т.к. исключение похожих последовательностей может считаться оптимальным подходом при выборе референсных сиквенсов для филогенетического анализа [12].

Реконструкцию эволюционных взаимоотношений со статистической обработкой данных осуществляли с использованием байесовского алгоритма с методами Монте-Карло по схеме цепи Марко-

ва, представленного в программном обеспечении «BEAST v1.8.4». Для аннотирования применяли «TreeAnnotator v1.8.4», последующую визуализацию дерева с максимальным доверием к кладам проводили в «FigTree 1.4.3».

Результаты и обсуждение

ДФО является неблагоприятной территорией по ЭВИ. Показатели регистрируемой в сезонный период заболеваемости ЭВИ ежегодно значительно превышают общероссийские (рис. 1). За проанализированный нами период времени с 2014 по 2018 г. в ДФО наблюдались 2 пика заболеваемости ЭВИ: в 2016 г. (40,4 на 100 тыс. населения) и 2018 г. (39,9 на 100 тыс. населения).

Среди субъектов ДФО наибольшее число случаев ЭВИ с 2006 по 2015 г. регистрировалось в Хабаровском крае (показатель заболеваемости в среднем равнялся 76,4 на 100 тыс. населения). С 2016 г. отмечен рост заболеваемости ЭВИ в Сахалинской области, достигший в 2018 г. максимума за 10 лет официальной регистрации инфекции. При этом Сахалинская область с 2016 по 2018 г. была лидирующим субъектом по заболеваемости ЭВИ и в ДФО, и в целом по России с показателями заболеваемости 103,0; 103,3 и 222,6 на 100 тыс. населения соответственно. Кроме того, в 2017 г. были впервые зафиксированы случаи ЭВИ в Чукотском автономном округе.

ЭВИ среди населения ДФО с 2014 по 2018 г. в основном протекала в виде герпангины, серозного менингита и экзантемы. В эпидемический процесс были вовлечены все возрастные группы, но основное количество заболеваний зарегистрировано

у детей 3–6 лет. Помимо спорадической заболеваемости ЭВИ в субъектах ДФО в 2014–2018 гг. фиксировались очаги инфекции в детских организованных коллективах, большинство из которых было обусловлено ЭВ Коксаки А6. Среди других неполиомиелитных ЭВ (НПЭВ), ответственных за вспышки ЭВИ в указанный период времени, следует отметить Коксаки А5, А10, В3, В4 и В5, ЕСНО6, 9 и 30.

С 2014 по 2018 г. в лаборатории Дальневосточного регионального научно-методического центра по изучению ЭВИ с помощью молекулярно-генетических методов исследованы пробы от 2494 человек из 9 субъектов ДФО. Были получены 1360 нуклеотидных последовательностей НПЭВ 39 типов, относившиеся к видам А (ЭВА — 54,1%), В (ЭВВ — 43,3%) и С (ЭВС — 2,6%). Несмотря на общее преобладание ЭВА в течение рассматриваемого в данной работе периода времени, в 2014 и 2016 гг. в ДФО доминировали ЭВВ. Внутри каждого вида наиболее часто выявляемыми типами НПЭВ были: среди ЭВА — Коксаки А6, А10 и А5; ЭВВ — ЕСНО30, ЕСНО6 и Коксаки В5; ЭВС — Коксаки А1, А19 и А24. ЭВ Коксаки А6 с 2014 по 2018 г. лидировал по количеству обнаружений во всех субъектах ДФО, кроме Приморского края, где преобладали ЕСНО-вирусы. Помимо Коксаки А6 наибольшее число идентифицированных в 2014–2018 гг. нуклеотидных последовательностей ЭВ в ДФО принадлежало к ЕСНО30 и Коксаки А10.

Всего за 2014–2018 гг. в ДФО методом секвенирования выявлено 120 штаммов ЭВ Коксаки А10, для 117 из которых удалось получить полные нуклеотидные последовательности участка генома VP1 длиной 894 н.о.. Циркуляция Коксаки А10 за-

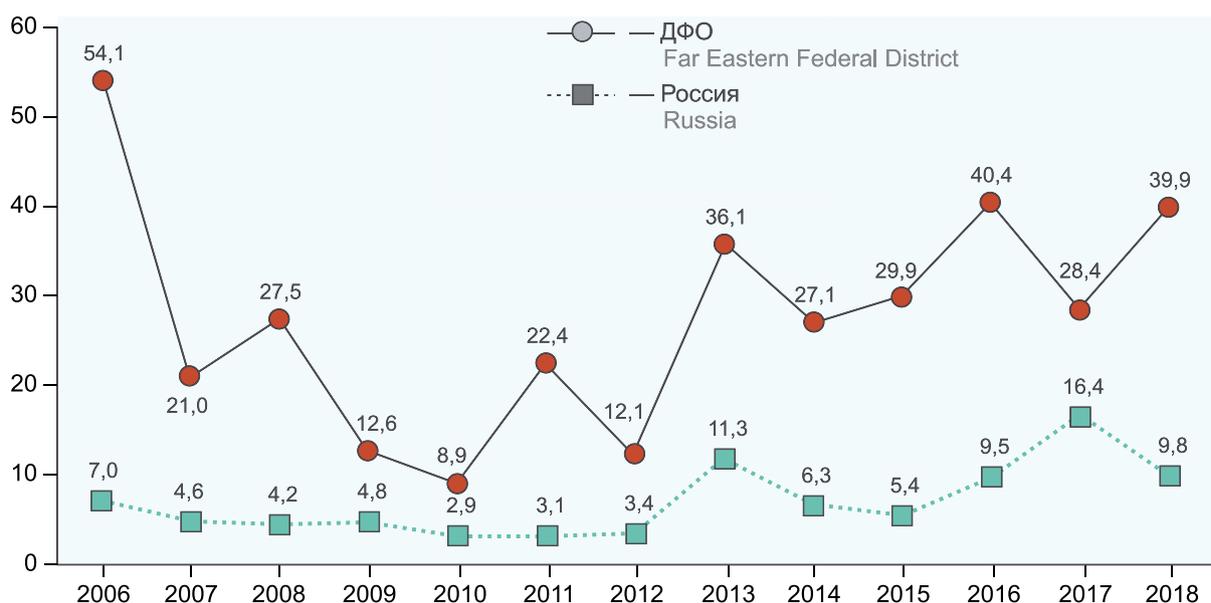


Рис. 1. Заболеваемость ЭВИ в ДФО в многолетней динамике в сравнении с Россией (на 100 тыс. населения).

Fig. 1. The incidence of enterovirus infections in the Far Eastern Federal District in long-term dynamics in comparison with Russia (per 100 thousand population).

фиксирована во всех субъектах ДФО, за исключением Чукотского автономного округа, где из НПЭВ молекулярно-генетическими методами обнаружен лишь Коксаки А6.

С 2014 по 2016 г. Коксаки А10 выявлялся в клиническом материале от лиц с подозрением на ЭВИ в небольшом количестве (процент выявляемости в эти годы от числа других НПЭВ составлял лишь 2,3–3,7%). В 2017 г. отмечена активизация циркуляции Коксаки А10 в ДФО (31,3% среди идентифицированных НПЭВ), который потеснил безусловного лидера предыдущих лет — ЭВ Коксаки А6. В 2017 г. получены 92 штамма Коксаки А10 (преимущественно из Хабаровского края и Сахалинской области), что составило 76,7% от числа всех выделенных Коксаки А10 за 2014–2018 гг. В 2018 г. Коксаки А10 был идентифицирован лишь в 1 (0,5%) случае.

Циркуляция Коксаки А10 в отдельных субъектах ДФО по годам также была неравномерной. Так, в 2014 г. он выявлялся в Республике Саха (Якутия) и Еврейской автономной области, в 2015 г. — в Хабаровском и Камчатском краях, в 2016 г. — в Хабаровском и Приморском краях, Амурской области и Республике Саха (Якутия). В 2017 г. Коксаки А10 был изолирован от пациентов с ЭВИ из Хабаровского и Приморского краев, Сахалинской, Еврейской автономной и Магаданской областей, Республики Саха (Якутия). При этом в 2017 г. Коксаки А10 обусловил подъем заболеваемости ЭВИ в Хабаровском крае и Сахалинской области. В 2018 г. удалось получить штамм Коксаки А10 только у 1 заболевшего ЭВИ ребенка из Приморского края.

Инфекция, вызванная ЭВ Коксаки А10, среди населения ДФО протекала в виде герпангины, респираторных проявлений и серозного менингита. Случаи тяжелого течения, осложнения после перенесенного заболевания не установлены.

С 2014 по 2018 г. в ДФО был зафиксирован лишь 1 очаг групповой заболеваемости, обусловленный Коксаки А10. Он идентифицирован у 4 детей с герпангиной, посещавших детский сад № 17 г. Амурска Хабаровского края в 2016 г.

Завозных случаев ЭВИ на территории ДФО с участием Коксаки А10 не было зарегистрировано, что может быть связано с недостаточным сбором эпидемиологического анамнеза у лиц с ЭВИ.

Филогенетический анализ полученных нами полных нуклеотидных последовательностей участка генома VP1 ЭВ Коксаки А10 показал, что с 2014 по 2018 г. на территории ДФО циркулировали 2 разные генетические линии этого вируса (рис. 2). Поскольку в настоящее время устоявшаяся система генотипов для ЭВ Коксаки А10 отсутствует [12], для удобства представления полученных данных в этой работе мы условно обозначили их как линии А и В. Различие между штаммами, относящимися

к разным линиям, составило 18–21% по нуклеотидной последовательности. Причем дивергенция линий А и В произошла около 1950 г. (95% доверительный интервал (ДИ) 1934–1966).

В состав генетической линии А вошли штаммы Коксаки А10, выявленные в Республике Саха (Якутия), Еврейской автономной и Сахалинской областях, Хабаровском и Приморском краях. На дендрограмме видно, что штаммы линии А разделились на 2 кластера (условно А1 и А2) с отличием нуклеотидных последовательностей 7–8%. Расхождение между ними возникло приблизительно в 2003 г. (95% ДИ 1999–2006). В состав кластера А1 вошли вирусы, изолированные в Еврейской автономной области и Республике Саха (Якутия) в 2014 г. и в Хабаровском крае в 2016 г. На филогенетическом дереве с ними сгруппировались штаммы Коксаки А10, выделенные во Франции в 2010 г., что позволяет предполагать их европейское происхождение.

Кластер А2 представлен вирусами, идентифицированными в Республике Саха (Якутия) в 2016 г., Сахалинской области в 2017 г. и Приморском крае в 2018 г. Кроме того, штамм Коксаки А10, относящийся к данному кластеру, был выявлен в субъекте Сибирского федерального округа (Красноярском крае) в 2017 г. при расследовании завозного случая ЭВИ из Турции.

Генетическая линия В на дендрограмме отличается более широким разнообразием относящихся к ней штаммов Коксаки А10 и также представлена двумя кластерами — условно В1 и В2. Расхождение между кластерами линии В произошло около 2002 г. (95% ДИ 1999–2005), а различие между нуклеотидными последовательностями составляет также 7–8%. В кластер В1 вошли большинство выделенных нами штаммов Коксаки А10. Это вирусы, циркулировавшие в 2015 г. в Хабаровском крае, в 2016 г. — в Приморском крае, в 2017 г. — в Хабаровском и Приморском краях, Еврейской автономной, Сахалинской и Магаданской областях, в Республике Саха (Якутия). С ними сгруппировались Коксаки А10, изолированные в Китае в 2010–2018 гг., в США в 2016 г., в Австралии в 2016–2017 гг., а также другие российские штаммы 2013, 2016 и 2017 гг. Вероятнее всего, дальневосточные Коксаки А10 из кластера В1 были завезены на территорию округа из соседнего государства — Китайской Народной Республики.

Следует отметить, что основное количество штаммов Коксаки А10 из кластера В1, выделенных в ДФО в 2017 г., образовали единую группу со штаммом LC412978, который был изолирован во время вспышки HFMD в китайской провинции Юньнань в 2017 г. Их общий предок существовал в 2014 г. (95% ДИ 2013–2015), что свидетельствует в пользу того, что подъем заболеваемости ЭВИ в

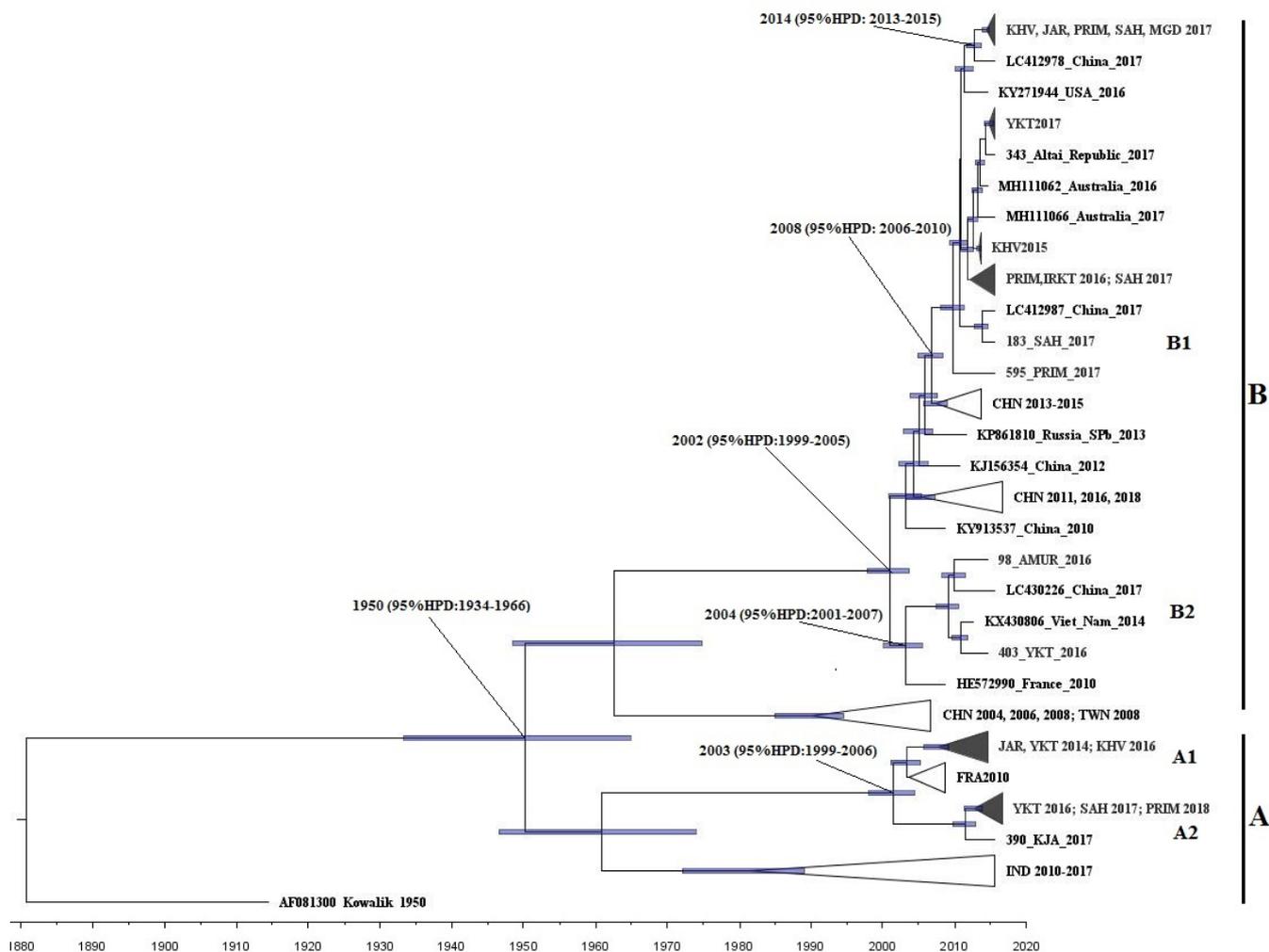


Рис. 2. Филогенетическое дерево с максимальным доверием к кладам для нуклеотидных последовательностей ЭВ Коксаки А10 (полная последовательность VP1 = 894 н.о.).

На дереве отражено время существования предшественников отдельных групп вирусов с использованием ДИ наибольшей апостериорной плотности 95%.

KHV — Хабаровский край, YKT — Республика Саха (Якутия), SAH — Сахалинская область, PRIM — Приморский край, MGD — Магаданская область, AMUR — Амурская область, JAR — Еврейская автономная область, IRKT — Иркутская область, KJA — Красноярский край. Для обозначения некоторых стран использована система ISO 3166-1 alpha-3.

Fig. 2. Maximum clade credibility tree for the Coxsackievirus A10 nucleotide sequences (complete sequence of VP1 = 894 b.p.).

The tree shows the age of the ancestors of certain groups of viruses using the confidence interval of the highest posterior density of 95%.

KHV — Khabarovsk Territory, YKT — Republic of Sakha (Yakutia), SAH — Sakhalin Region, PRIM — Primorsky Territory, MGD — Magadan Region, AMUR — Amur Region, JAR — Jewish Autonomous Region, IRKT — Irkutsk Region, KJA — Krasnoyarsk Territory. For some countries, the ISO 3166-1 alpha-3 system is used.

2017 г. в ряде субъектов ДФО (в Хабаровском крае и Сахалинской области), связанный с ростом выявляемости Коксаки А10 в клиническом материале, мог быть обусловлен завозом «нового» эпидемического варианта вируса, который на протяжении ряда лет циркулирует в Китае с формированием вспышечных очагов.

В состав кластера В2 вошли штаммы Коксаки А10, изолированные в Республике Саха (Якутия) и Амурской области в 2016 г., которые сгруппировались с вирусами, выделенными во Вьетнаме в 2014 г. и Китае в 2017 г. соответственно. Дальневосточные

вирусы Коксаки А10 из кластера В2 имеют общего предшественника с французскими вирусами 2010 г., который существовал приблизительно в 2004 г. (95% ДИ 2001–2007). Рассматривая группу, образованную штаммами 98_AMUR_2016/LC430226_China_2017, можно предположить, что активные миграционные и социально-экономические связи между государствами способствуют не только завозу ЭВ на территорию России, но и их распространению с ее территории в соседние страны, что в целом отражает обширную циркуляцию ЭВ среди населения мира без учета географических границ.

Заключение

Коксаки А10 можно считать одним из наиболее актуальных для ДФО типом НПЭВ, учитывая его непрерывную циркуляцию в округе с 2014 по 2018 г. Проведенный филогенетический анализ позволил выявить генетическое разнообразие этого ЭВ в ДФО, а также одновременное присутствие вирусов из разных линий (А2 и В1) в одном субъекте — Сахалинской области в 2017 г. Вероятнее всего, полученные дальневосточные штаммы Коксаки А10 имели как европейское, так и азиатское происхождение. Появляющиеся «новые» эпидемические варианты способствуют возникновению подъемов заболеваемости. Кроме того, филогенетический анализ показал, что существует возможность распространения Коксаки А10 из России в сопредельные государства.

К сожалению, среди представленных в GenBank нуклеотидных последовательностей Коксаки А10, подходивших по размеру и качеству для филогенетического анализа в данной работе, нет большого географического разнообразия, что не позволило более широко рассмотреть пути циркуляции данного вируса. Тем не менее дальнейший надзор за ЭВИ в целом и за отдельными типами НПЭВ, в том числе Коксаки А10, а также размещение в GenBank полученных нами нуклеотидных последовательностей позволят пополнить международную базу данных и расширить представление об их молекулярной эпидемиологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pallansch M.A., Roos R. Enteroviruses: Polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007: 839-93.
2. EV-A Prototypes. Available at: http://www.picornaviridae.com/enterovirus/prototypes/ev-a_prototypes.htm
3. Tapparel C., Siegrist F., Petty T.J., Kaiser L. Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases. *Infect. Genet. Evol.* 2013; 14: 282-93. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.10.016>
4. Chen M., He S., Yan Q., Xu X., Wu W., Ge S., et al. Severe hand, foot and mouth disease associated with Coxsackievirus A10 infections in Xiamen, China in 2015. *J. Clin. Virol.* 2017; 93: 20-4. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jcv.2017.05.011>
5. Fuschino M.E., Lamson D.M., Rush K., Carbone L.S., Taff M.L., Hua Z., et al. Detection of coxsackievirus A10 in multiple tissues of a fatal infant sepsis case. *J. Clin. Virol.* 2012; 53(3): 259-61. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.12.011>
6. Lu Q.B., Zhang X.A., Wo Y., Xu H.M., Li X.J., Wang X.J., et al. Circulation of Coxsackievirus A10 and A6 in hand-foot-mouth disease in China, 2009–2011. *PLoS One.* 2012; 7(12): e52073. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0052073>
7. Blomqvist S., Klemola P., Kaijalainen S., Paananen A., Simonen M.L., Vuorinen T., et al. Co-circulation of coxsackieviruses A6 and A10 in hand, foot and mouth disease outbreak in Finland. *J. Clin. Virol.* 2010; 48(1): 49-54. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jcv.2010.02.002>
8. Davia J.L., Bel P.H., Ninet V.Z., Bracho M.A., González-Candelas F., Salazar A., et al. Onychomadesis outbreak in Valencia,

- Spain associated with hand, foot, and mouth disease caused by enteroviruses. *Pediatr. Dermatol.* 2011; 28(1): 1-5. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1525-1470.2010.01161.x>
9. Wu Y., Yeo A., Phoon M.C., Tan E.L., Poh C.L., Quak S.H., et al. The largest outbreak of hand; foot and mouth disease in Singapore in 2008: the role of enterovirus 71 and coxsackievirus A strains. *Int. J. Infect. Dis.* 2010; 14(12): e1076-81. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.ijid.2010.07.006>
 10. Mirand A., Henquell C., Archimbaud C., Ughetto S., Antona D., Bailly J.L., et al. Outbreak of hand, foot and mouth disease/herpangina associated with coxsackievirus A6 and A10 infections in 2010, France: a large citywide, prospective observational study. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012; 18(5): E110-8. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03789.x>
 11. Yang Q., Ding J., Cao J., Huang Q., Hong C., Yang B. Epidemiological and etiological characteristics of hand, foot, and mouth disease in Wuhan, China from 2012 to 2013: outbreaks of coxsackieviruses A10. *J. Med. Virol.* 2015; 87(6): 954-60. DOI: <http://doi.org/10.1002/jmv.24151>
 12. Лукашев А.Н., Голицына Л.Н., Вакуленко Ю.А., Ахмадишина Л.В., Романенкова Н.И., Сапега Е.Ю. и др. Современные возможности и направления развития молекулярно-эпидемиологического мониторинга в надзоре за энтеровирусными инфекциями. Опыт Российской Федерации. *Инфекция и иммунитет.* 2018; 8(4): 452-64. DOI: <http://doi.org/10.15789/2220-7619-2018-4-452-464>

REFERENCES

1. Pallansch M.A., Roos R. Enteroviruses: Polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007: 839-93.
2. EV-A Prototypes. Available at: http://www.picornaviridae.com/enterovirus/prototypes/ev-a_prototypes.htm
3. Tapparel C., Siegrist F., Petty T.J., Kaiser L. Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases. *Infect. Genet. Evol.* 2013; 14: 282-93. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.10.016>
4. Chen M., He S., Yan Q., Xu X., Wu W., Ge S., et al. Severe hand, foot and mouth disease associated with Coxsackievirus A10 infections in Xiamen, China in 2015. *J. Clin. Virol.* 2017; 93: 20-4. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jcv.2017.05.011>
5. Fuschino M.E., Lamson D.M., Rush K., Carbone L.S., Taff M.L., Hua Z., et al. Detection of coxsackievirus A10 in multiple tissues of a fatal infant sepsis case. *J. Clin. Virol.* 2012; 53(3): 259-61. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.12.011>
6. Lu Q.B., Zhang X.A., Wo Y., Xu H.M., Li X.J., Wang X.J., et al. Circulation of Coxsackievirus A10 and A6 in hand-foot-mouth disease in China, 2009–2011. *PLoS One.* 2012; 7(12): e52073. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0052073>
7. Blomqvist S., Klemola P., Kaijalainen S., Paananen A., Simonen M.L., Vuorinen T., et al. Co-circulation of coxsackieviruses A6 and A10 in hand, foot and mouth disease outbreak in Finland. *J. Clin. Virol.* 2010; 48(1): 49-54. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jcv.2010.02.002>
8. Davia J.L., Bel P.H., Ninet V.Z., Bracho M.A., González-Candelas F., Salazar A., et al. Onychomadesis outbreak in Valencia, Spain associated with hand, foot, and mouth disease caused by enteroviruses. *Pediatr. Dermatol.* 2011; 28(1): 1-5. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1525-1470.2010.01161.x>
9. Wu Y., Yeo A., Phoon M.C., Tan E.L., Poh C.L., Quak S.H., et al. The largest outbreak of hand; foot and mouth disease in Singapore in 2008: the role of enterovirus 71 and coxsackievirus A strains. *Int. J. Infect. Dis.* 2010; 14(12): e1076-81. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.ijid.2010.07.006>
10. Mirand A., Henquell C., Archimbaud C., Ughetto S., Antona D., Bailly J.L., et al. Outbreak of hand, foot and mouth disease/herpangina associated with coxsackievirus A6 and A10 infections

in 2010, France: a large citywide, prospective observational study. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012; 18(5): E110-8.

DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03789.x>

11. Yang Q., Ding J., Cao J., Huang Q., Hong C., Yang B. Epidemiological and etiological characteristics of hand, foot, and mouth disease in Wuhan, China from 2012 to 2013: outbreaks of coxsackieviruses A10. *J. Med. Virol.* 2015; 87(6): 954-60. DOI: <http://doi.org/10.1002/jmv.24151>

12. Lukashov A.N., Golitsyna L.N., Vakulenko Yu.A., Akhmadishina L.V., Romanenkova N.I., Sapega E.Yu., et al. Current possibilities and potential development of molecular enterovirus surveillance. Experience of Russian Federation. *Infektsiya i immunitet.* 2018; 8(4): 452-64.

DOI: <http://doi.org/10.15789/2220-7619-2018-4-452-464> (in Russian)

Информация об авторах:

Бутакова Людмила Васильевна[✉] — н.с. Дальневосточного регионального научно-методического центра по изучению энтеровирусных инфекций ФБУН «Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии», 680610, Хабаровск, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7238-3691>. E-mail: evi.khv@mail.ru

Сапега Елена Юрьевна — к.м.н., в.н.с., рук. Дальневосточного регионального научно-методического центра по изучению энтеровирусных инфекций ФБУН «Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии», 680610, Хабаровск, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4438-6913>.

Троценко Ольга Евгеньевна — д.м.н., директор ФБУН «Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии», 680610, Хабаровск, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3050-4472>.

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

Information about the authors:

Lyudmila V. Butakova[✉] — researcher, Far Eastern regional scientific methodological center for the study of enterovirus infection, Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 680610, Khabarovsk, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7238-3691>. E-mail: evi.khv@mail.ru

Elena Yu. Sapega — PhD (Med.), leading researcher, Head, Far Eastern regional scientific methodological center for the study of enterovirus infection, Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 680610, Khabarovsk, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4438-6913>.

Olga E. Trotsenko — D. Sci. (Med.), Director, Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 680610, Khabarovsk, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7238-3691>.

Contribution: the authors contributed equally to this article.



Особенности получения белкового комплекса вегетативных культур *Bacillus anthracis* для протеомного картирования штаммов

Котенева Е.А.[✉], Цыганкова О.И., Калинин А.В., Родионов И.С., Абрамович А.В., Щербакова В.Ю.

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, 355035, Ставрополь, Россия

Введение. Исследование белкового состава возбудителя сибирской язвы *Bacillus anthracis* позволяет выявлять как общие видовые характеристики, так и индивидуальные особенности штаммов, различающихся по фенотипическим свойствам, проявляющимся в основном в вегетативной форме и имеющим важное значение для вирулентности, иммуногенности и способности адаптироваться к разным условиям вегетирования.

Цель работы — на группе штаммов *B. anthracis*, имеющих разный плазмидный состав и вирулентность, апробировать разные способы экстракции тотального протеома из вегетативных клеток бацилл.

Результаты. Показано, что скорость спорообразования значительно варьирует между отдельными штаммами *B. anthracis* и может оказать существенное влияние на эффективность экстракции и состав белкового комплекса. Предварительная обработка лизоцимом, влияющим на клеточную оболочку, способствует более полному лизису клеток, а ультрамикрочентрифужная фильтрация обеспечивает полную специфическую стерильность полученных образцов.

Заключение. Разработана схема подготовки культур *B. anthracis*, позволяющая получать культуру в вегетативной фазе жизненного цикла и эффективно экстрагировать белки в сочетании с надежным обеззараживанием образцов.

Ключевые слова: протеом; сибирская язва; *Bacillus anthracis*; спорообразование; MALDI-TOF/TOF MS; 2D-гель-электрофорез; вегетативная форма; методы экстракции белков.

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: Котенева Е.А., Цыганкова О.И., Калинин А.В., Родионов И.С., Абрамович А.В., Щербакова В.Ю. Особенности получения белкового комплекса вегетативных культур *Bacillus anthracis* для протеомного картирования штаммов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(4): 331–338.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-.5>

Поступила 20.03.2020
Принята в печать 27.06.2020

Features of obtaining the protein complex of vegetative cultures *Bacillus anthracis* for proteomic mapping of strains

Elena A. Koteneva[✉], Olga I. Tsygankova, Aleksander V. Kalinin, Ivan S. Rodionov, Alena V. Abramovich, Victoriya Yu. Shcherbakova

Stavropol Research Antiplague Institute, 355035, Stavropol, Russia

Introduction. The study of the protein composition of the causative agent of anthrax — *Bacillus anthracis*, allows you to identify both general species and individual characteristics of strains that differ in phenotypic properties, manifested mainly in the vegetative form and which are important for virulence, immunogenicity and the ability to adapt to different vegetation conditions.

Purpose of the work. In the group of anthrax microbe strains having different plasmid composition and virulence, different methods of extraction of the total proteome from vegetative bacillus cells have been tested.

Results. In the course of the work, it was shown that the rate of spore formation varies significantly between individual strains of the anthrax microbe and can have a significant impact on the efficiency of extraction and the composition of the protein complex. Preliminary treatment with lysozyme, which affects the cell membrane,

promotes a more complete lysis of cells, and ultramicrocentrifuge filtration provides complete specific sterility of the obtained samples.

Conclusion. A culture preparation scheme was developed for *B. anthracis*, which allows one to obtain a culture in the vegetative phase of the life cycle and to efficiently extract proteins in combination with reliable disinfection of samples.

Keywords: proteome; anthrax; *Bacillus anthracis*; spore formation; MALDI-TOF/TOF MS; 2D-gel electrophoresis; vegetative form; protein extraction methods.

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: Koteneva E.A., Tsygankova O.I., Kalinin A.V., Rodionov I.S., Abramovich A.V., Shcherbakova V.Yu. [Features of obtaining the protein complex of vegetative cultures *Bacillus anthracis* for proteomic mapping of strains]. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(4): 331–338. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-5>

Received 20 March 2020

Accepted 27 June 2020

Введение

Изучение протеома патогенных микроорганизмов является актуальной задачей, т.к. позволяет не только выявить основные и вспомогательные факторы вирулентности, но и объективно оценить их продукцию в конкретных условиях культивирования в лабораторных условиях или при естественной циркуляции в организме животных и человека и во внешней среде. Исследование белкового состава возбудителя сибирской язвы *Bacillus anthracis* позволяет определить как общие видовые характеристики, так и индивидуальные особенности штаммов, различающихся по фенотипическим свойствам, проявляющимся в основном в вегетативной форме и имеющим важное значение для вирулентности, иммуногенности и способности адаптироваться к разным условиям вегетирования.

Для объективной оценки особенностей протеомов штаммов *B. anthracis* необходимо, чтобы источником выделения белкового комплекса являлась чистая культура с однородной по основным фенотипическим признакам популяцией. Не менее важным условием качественной пробоподготовки является нахождение культуры в одной морфофункциональной фазе, т.к. при работе с возбудителем сибирской язвы формирование спор влечет изменение белкового состава культур, что может приводить к некорректным результатам сравнительного анализа белковых комплексов штаммов, различающихся по скорости спорообразования. Так, около половины проб вегетативных культур представителей группы *Bacillus cereus* при исследовании масс-спектрометрическим методом имеют пики, характерные для спектров споровых форм [1, 2]. Непосредственно метод лизиса культуры должен быть эффективным по отношению к культурам, имеющим особенности состава и строения поверхностных клеточных структур, для наиболее полного извлечения белков и предусматривать их защиту от деградации, в том числе под действием собственных протеаз.

Полученный на конечном этапе материал должен включать весь спектр белков, присущих микроорганизму в конкретных условиях, в концентрации, достаточной для проведения протеомных исследований, и не содержать жизнеспособных клеток микроорганизмов.

Цель работы — разработка алгоритма получения и эффективной экстракции белкового комплекса вегетативных культур *B. anthracis*, отвечающего требованиям режима работы с возбудителями особо опасных инфекций.

Материалы и методы

В работе использовали вакцинные штаммы *B. anthracis* СТИ, 228/8, Sterne 34F2, 55, СТИ-ПР, 71/12, Ихтиман, вирулентные штаммы 140 П, 228, 1265, 1(СО) и 81/1, а также их культуральные варианты ΔСТИ, СТИ-П, ΔSterne 34F2, 228/8-П, 228/4, 1(СО)-5-1, 1(СО)-16, 1(СО)-23, 1(СО)-24, которые различались по генетическим характеристикам (все варианты плазмидного состава, различные MLVA- и SNP-генотипы) и по фенотипическим признакам: культурально-морфологическим свойствам, токсинопродукции, ферментативной активности, условиям формирования капсулы, вирулентности, чувствительности к специфическим сибиреязвенным бактериофагам.

В качестве питательных сред использовали LB-бульон и LB-агар (по Ленноксу), а при необходимости добавляли кровь (5%), сыворотку крови (10%), глицерин (4%).

Спорообразование контролировали визуально в мазках, окрашенных по Ребигеру, приготовленных из культур на различных этапах культивирования. Подсчитывали долю бациллярных клеток, содержащих формирующиеся споры, и отмечали наличие внеклеточно расположенных спор.

Процесс пробоподготовки включал предварительную обработку клеток лизоцимом, разрушающим клеточную стенку, в конечной концентрации

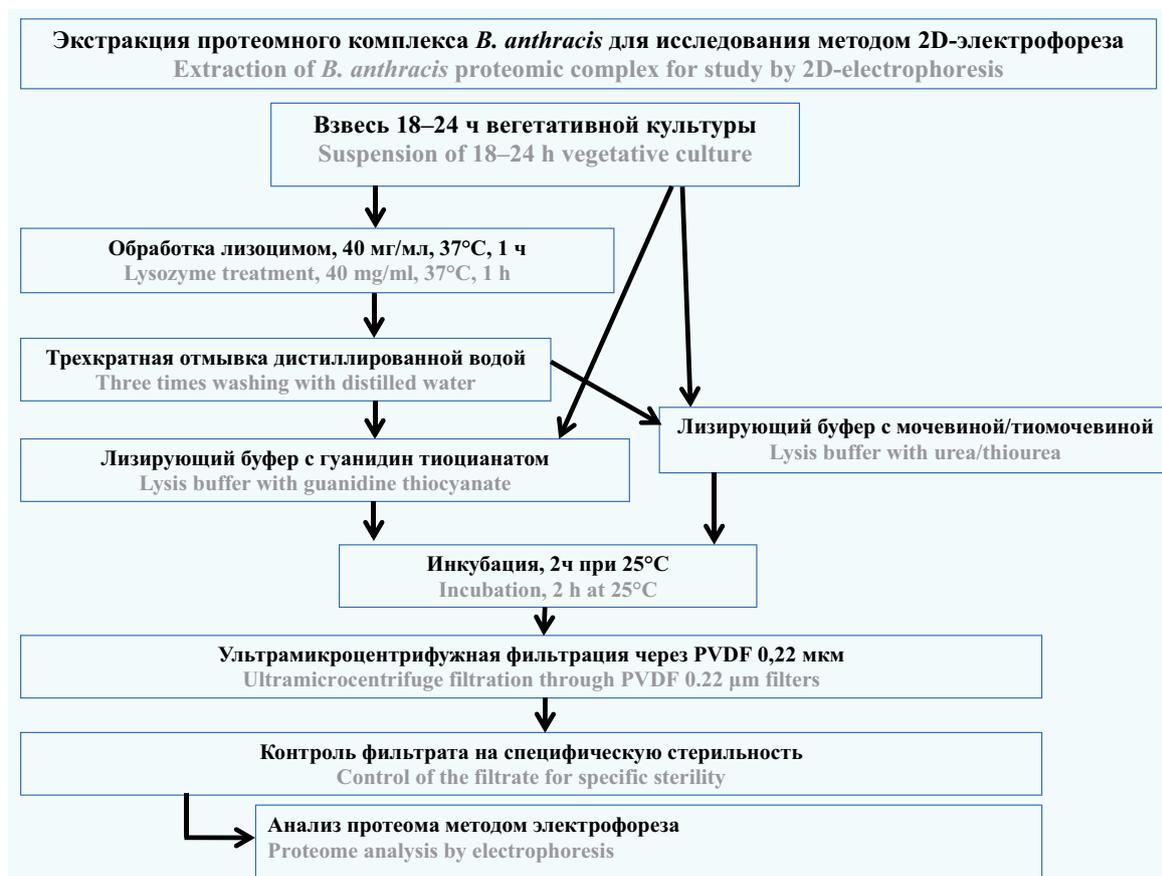


Рис. 1. Схема опыта по подбору оптимальных условий экстракции тотального протеома штаммов *B. anthracis*.
Fig. 1. An experimental design for selecting optimal extraction conditions for a total proteome of *B. anthracis* strains.

40 мг/мл с инкубацией 1 ч при 37°C. Далее образцы дважды отмывали в 40 мМ растворе основного Трис-буфера от лизоцима и клеточного дебриса. Экстракцию тотального протеома проводили параллельно для каждого образца в 2 лизирующих буферах: 8 М мочевины/2 М тиомочевина и 6 М гуанидина тиоцианат. Для предотвращения деградации экстрагируемых белков в лизирующий буфер вносили ингибиторы бактериальных протеаз в концентрации 1 мкг/мл. Обеззараживание проб проводили методом ультрамикрочентрифужной фильтрации лизата через фильтр PVDF с размером пор 0,22 мкм. Специфическую стерильность полученного материала подтверждали отрицательными результатами посева на LB-агар.

Характер воздействия лизирующих буферов оценивали визуально по состоянию культуры в окрашенных мазках на различных этапах подготовки материала. Сравнительную оценку полноты экстракции белкового комплекса из бациллярных клеток осуществляли по количеству и интенсивности белковых полос, полученных при одномерном электрофоретическом разделении образцов на автоматической системе капиллярного электрофореза «Experion» («Bio-Rad») с использованием набора «Experion Pro260 Analysis Kit» («Bio-Rad») после

предварительной очистки образцов набором «Ready Prep 2-D Cleanup Kit» («Bio-Rad»).

Двумерный электрофорез проводили с использованием комплекта оборудования для протеомных исследований («Bio-Rad») и специализированного программного обеспечения «Quantity One 1-D analysis software» и «PDQuest 2-D analysis software». Концентрацию образцов перед проведением 1-го направления измеряли на флюориметре «Qubit» и параллельно методом Бредфорда. Изоэлектрофокусировку проводили с использованием стрипов «ReadyStrip IPG strips» pH 3–10, 7 см, загружая образцы из расчета 10–15 мкг белка на 300 мкл регидратационного буфера. Уравновешивание стрипов осуществляли в буфере с 6 М мочевиной в два этапа: с 2% дитиотреитолом и 2,5% йодацетамидом по 15 мин. Второе направление проводили в камере «Mini Protean» с охлаждением 10°C в 12% ПААГ в течение ~1,5 ч. Готовые гели окрашивали серебром с использованием набора «Silver Stain Plus».

За основу взяли методику, описанную в работах [3–6], с авторскими модификациями, включающими предварительную обработку культуры лизоцимом, а также различные варианты состава лизирующих буферов. Посев вегетативной культуры для дальнейшего исследования протеомными методами

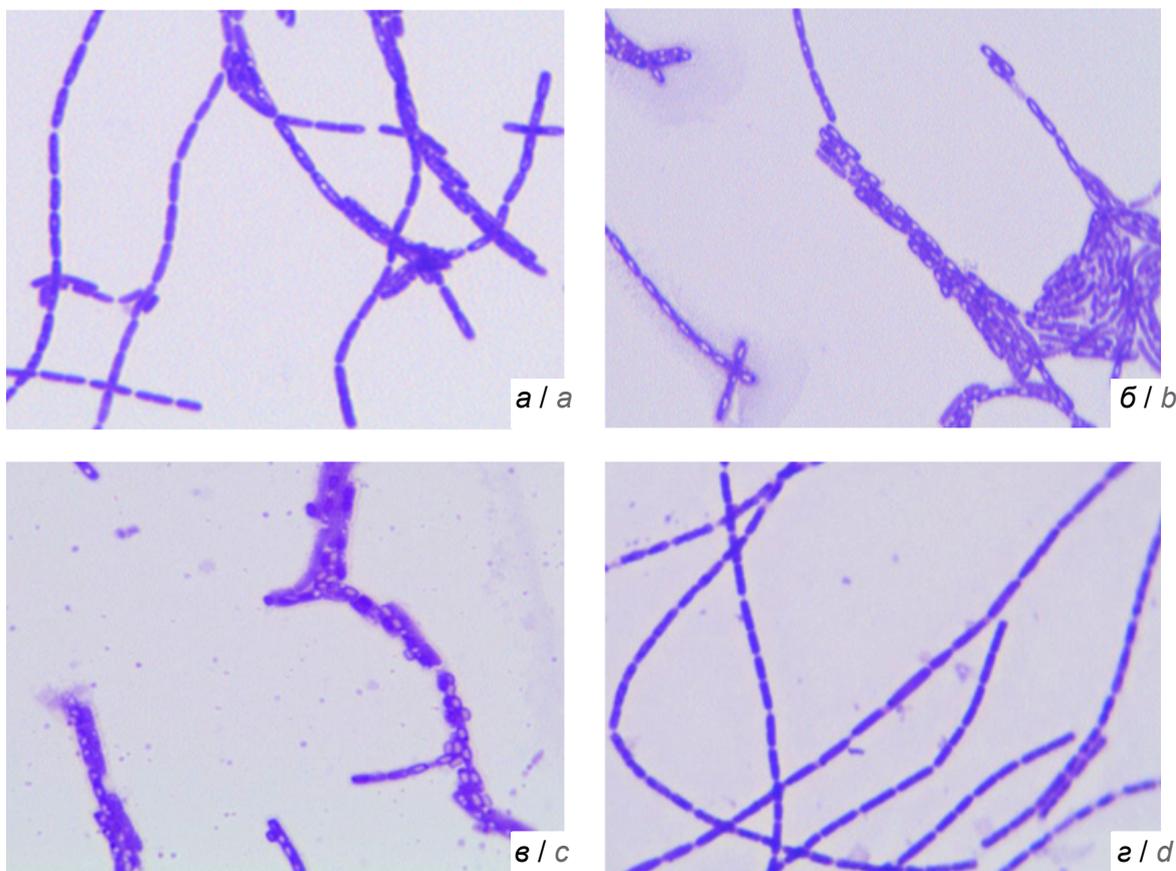


Рис. 2. Различия в спорообразовании на LB-агаре 20-часовых культур штаммов *B. anthracis* Δ Sterne (а), Sterne 34F2 (б) и Δ СТИ (в), а также 6-часовой культуры штамма Sterne (д).

Окраска методом Ребигера, ув. 500.

Fig. 2. Differences in spore formation on LB agar of 20-hour cultures of *B. anthracis* Δ Sterne strains (a), Sterne 34F2 (b) and Δ STI (c), as well as a 6-hour culture of Sterne strain (d).

Coloring with the Rebiger method, $\times 500$.

проводили в несколько этапов, чтобы минимизировать образование спор: первоначальный посев на LB-агар (20 ч) для отбора изолированных колоний и пересева в LB-бульон (18 ч) с последующим пересевом на LB-агар (18 ч). Схема опыта представлена на **рис. 1**.

Результаты

На мазках, приготовленных из культуры на последнем этапе, выявили значительные различия скорости спорообразования изученных культур. Так, у штаммов *B. anthracis* 55, СТИ, СТИ-II, СТИ-ПР, 228/8-II, 228/4, Δ Sterne, 140-II, 1265, 81/1, 228/8, Ихтиман, 71/12, 1(CO), 1(CO)-5-1 наблюдали 2–30% бактериальных клеток, содержащих споры на различных этапах формирования (**рис. 2, а**). В то же время у штаммов Sterne 34F2 и Δ СТИ достаточно сформированные споры наблюдались в 82–88% бактериальных клеток, а у штамма Δ СТИ они располагались свободно вне бацилл (**рис. 2, б, в**).

На следующем этапе работы попытались добиться отсутствия спор в культурах путем добавления в LB-агар добавок, тормозящих процесс спо-

рообразования — глицерина, дефибрированной крови и инактивированной сыворотки крови, а также путем изменения сроков инкубирования культур. Для этого были выбраны штаммы *B. anthracis* 55, Sterne 34F2, Δ СТИ с различной скоростью спорообразования. Использовали жидкую и плотные питательные среды на основе LB-бульона: LB-бульон, LB-агар, LB-агар с добавлением 5% дефибрированной крови, LB-агар с добавлением 4% глицерина. Споры засевали в LB-бульон и оставляли на 6 ч при 37°C, после чего культуру пересевали в новую порцию LB-бульона и помещали на 18 ч при 37°C. На следующий день 18-часовую бульонную культуру высевали пипеткой на плотные питательные среды и распределяли по всей поверхности шпателем, инкубировали 6 ч при 37°C. После этого из культуры готовили взвесь и оставляли при –20°C на ночь. На всех этапах пересевов и приготовления взвеси готовили мазки для контроля спорообразования. При таких сроках выращивания в окрашенных мазках ни у одного из штаммов на всех средах споры не обнаруживались (**рис. 2, г**). Учитывая, что культура предназначена для исследования особенно-

стей протеомного комплекса различных штаммов, а также возможность экстракции белков крови или сыворотки при смывании культуры с поверхности среды, которые в дальнейшем могут искажать картину белкового спектра культур, получаемую методом 2D-электрофореза, вероятно, предпочтительнее использовать на последнем этапе пересевов культур LB-агар без добавок.

При использовании метода 2D-электрофореза важным фактором эффективной подготовки материала является полнота извлечения белкового комплекса из бациллярных клеток. Для разрушения бактериальных клеток и экстракции внутриклеточного белкового комплекса использовали лизирующие буферы, содержащие хаотропные вещества (гуанидина тиоцианат, мочевины, тиомочевина), разрушающие мембранные структуры, поверхностно активные вещества, способствующие максимальному извлечению белков, восстановитель, способный восстанавливать структуру белковых молекул, нарушенную денатурирующим действием хаотроп-

ных веществ, и коктейль ингибиторов протеаз, предотвращающий деградацию белков под действием внутриклеточных протеаз. Далее в работе использовали взвеси 20-часовых культур авирулентных штаммов *B. anthracis* СТИ, 228/8, Sterne 34F2, 55, СТИ-ПР, 71/12, Ихтиман, вирулентных — 140 П, 228, 1265, 1(CO) и 81/1, а также их культуральных вариантов ΔСТИ, СТИ-П, ΔSterne 34F2, 228/8-П, 228/4, 1(CO)-5-1, 1(CO)-16, 1(CO)-23 и 1(CO)-24.

Культуры всех штаммов после обработки лизоцимом образовывали конгломераты слабоокрашенных бациллярных клеток в виде комочков, за исключением штаммов *B. anthracis* 1(CO)-23 и 1(CO)-24, которые сохраняли длинные цепочки. Результаты микроскопии мазков на различных этапах выявили некоторые особенности у отдельных штаммов. Исходная 20-часовая культура штамма *B. anthracis* ΔСТИ содержала уже вполне сформировавшиеся споры, в том числе расположенные внеклеточно, и практически полностью лизировалась при всех вариантах обработки лизирующими буферами в

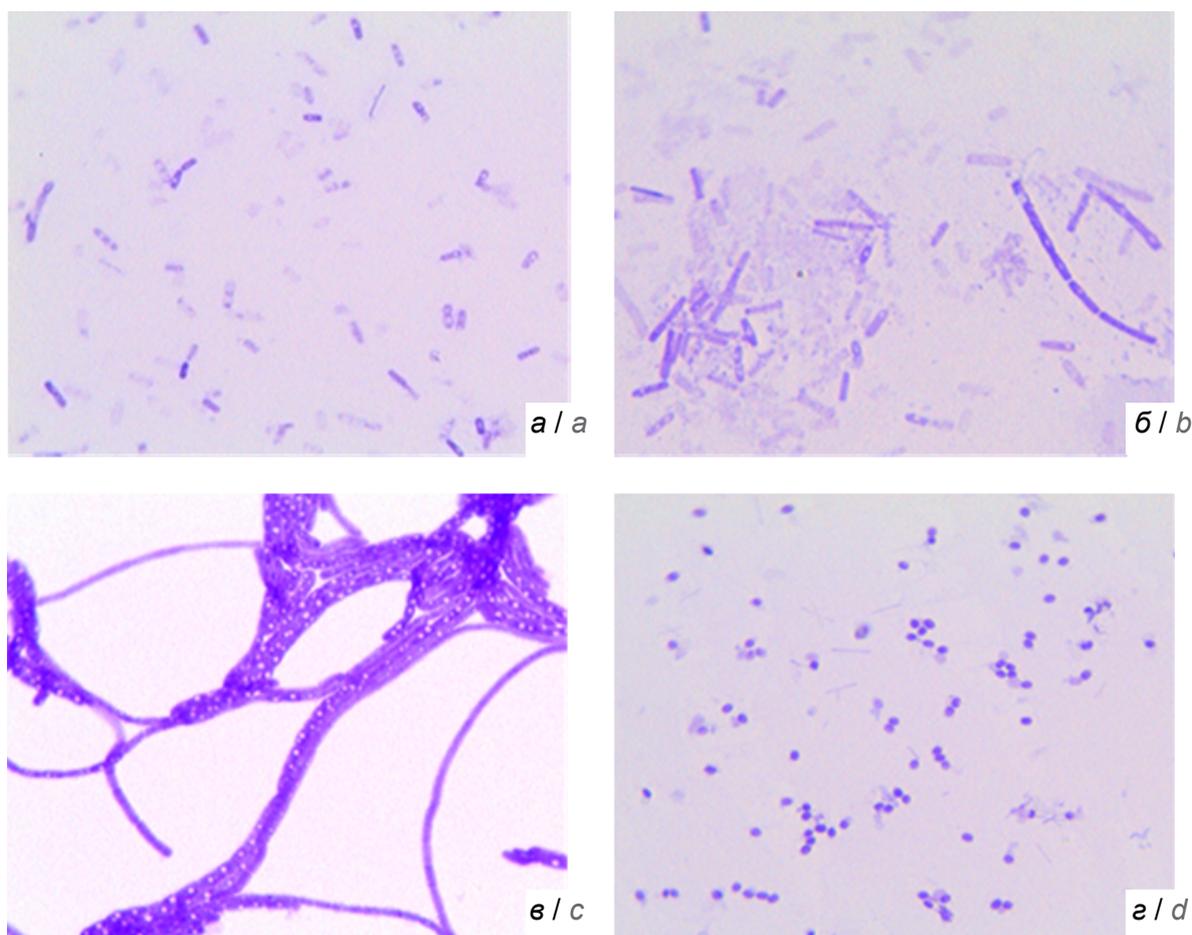


Рис. 3. Микрофотографии осадка бактериальных клеток штаммов *B. anthracis* после последовательной обработки лизоцимом и лизирующим буфером с 6 М гуанидина тиоцианатом: а — 1(CO); б — 1(CO)-5-1; в — 1(CO)-24; г — ΔСТИ. Окраска методом Ребигера, ув. 500.

Fig. 3. Microphotographs of the sediment of bacterial cells of *B. anthracis* strains after sequential treatment with lysozyme and lysis buffer with 6 M guanidine thiocyanate: а — 1(CO); б — 1(CO)-5-1; в — 1(CO)-24; г — ΔСТИ. Coloring with the Rebiger method, ×500.

сочетании с лизоцимом, в результате чего в мазках наблюдались свободно лежащие споры и детрит бактериальных клеток (рис. 3, з).

После воздействия лизирующего раствора, содержащего 6 М гуанидина тиоцианата, на нативные (не обработанные лизоцимом) взвеси бацилл в мазках наблюдали характерные для штаммов *B. anthracis* цепочки клеток, окраска которых была менее интенсивной и неравномерной по сравнению с исходной культурой. Наименьшие изменения претерпели штаммы *B. anthracis* 1(CO)-23 и 1(CO)-24.

При обработке бактериальных взвесей лизирующим раствором с 8 М мочевиной/2 М тиомочевинной видимые изменения культур были минимальными — окраска клеток становилась несколько слабее, а у штаммов 1(CO)-23 и 1(CO)-24 она практически не менялась. Бациллы штамма 1(CO)-5-1 располагались в окружении вещества, аналогично по окраске капсульному.

Воздействие лизирующих растворов на бациллы, предварительно обработанные лизоцимом, приводило у большинства изученных штаммов к образованию бактериального детрита и слабоокрашенных «теней» бактериальных клеток (рис. 3, а, б), штаммы 55, 71/12 сохраняли цепочки, в которых клетки прокрашивались значительно слабее нативной культуры, культура штамма 1(CO)-24 визуально практически не менялась (рис. 3, в).

При оценке результатов экстракции белкового комплекса вегетативных культур *B. anthracis* наиболее эффективным методом оказывался лизис буфером, содержащим 6 М гуанидина тиоцианат, после предварительной обработки лизоцимом.

Наибольшее количество белковых фракций выявляли в материале классического по фенотипическим свойствам и плазмидному составу вирулентного штамма *B. anthracis* 1(CO). На электрофореграмме у него наблюдалось наибольшее количество полос, особенно в области 25–75 кД. Штамм *B. anthracis* 1(CO)-5-1, имеющий полный набор плазмид и обладающий способностью формировать капсулу на обычных питательных средах, в том числе LB-агаре, в атмосфере воздуха, несмотря на наличие выраженного слоя капсульного вещества, демонстрировал большое количество белковых полос, которые были несколько менее интенсивно выражены, в отличие от исходного штамма *B. anthracis* 1(CO). У остальных штаммов в области 50–75 кД наблюдалось меньшее количество полос, особенно у изогенных вариантов штамма *B. anthracis* 1(CO): 1(CO)-16 (нарушение прорастания спор при повышенном содержании CO₂), 1(CO)-23 (бесплазмидный) и 1(CO)-24 (отсутствие плазмиды pXO1). Следует отметить, что указанные культуральные варианты штамма 1(CO) были выделены по признаку фагорезистентности к специфическим сибиреязвенным бактериофагам. Меньшее количество

белковых фракций штамма 1(CO) наблюдалось при обработке этим же лизирующим буфером нативной культуры: отмечалось некоторое (незначительное) снижение на электрофореграмме количества и интенсивности линий, соответствующих белкам с молекулярной массой 50–75 кД.

Экстракция белкового комплекса бацилл при воздействии лизирующего буфера, содержащего 8 М мочевины/2 М тиомочевину, была менее эффективной именно в области белков с молекулярной массой более 50 кД; лизирующий эффект, как и в предыдущем случае, был более выражен при предварительной обработке культуры лизоцимом.

Описанные различия в эффективности экстракции бациллярных белков двумя лизирующими буферами с различными составами с предварительной обработкой культуры лизоцимом и в ее отсутствие продемонстрированы на примере типичного вирулентного штамма *B. anthracis* 1(CO) (рис. 4).

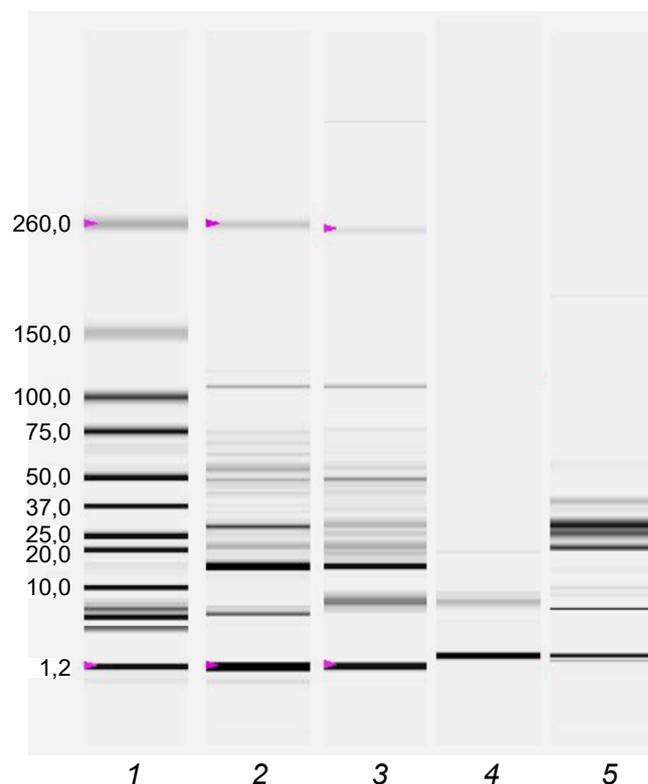


Рис. 4. Разделение белков штамма *B. anthracis* 1(CO), выделенных лизисом культуры: 2 — раствором с гуанидина тиоцианатом после обработки лизоцимом; 3 — тем же раствором без обработки лизоцимом; 4 — раствором с мочевиной/тиомочевинной после обработки лизоцимом; 5 — тем же раствором без обработки лизоцимом. 1 — маркер молекулярных масс белков.

Fig. 4. The separation of proteins of the strain *B. anthracis* 1(CO), isolated by culture lysis: 2 — a solution with guanidine thiocyanate after treatment with lysozyme; 3 — the same solution without treatment with lysozyme; 4 — a solution with urea/thiourea after treatment with lysozyme; 5 — the same solution without treatment with lysozyme. 1 — marker of molecular masses of proteins.

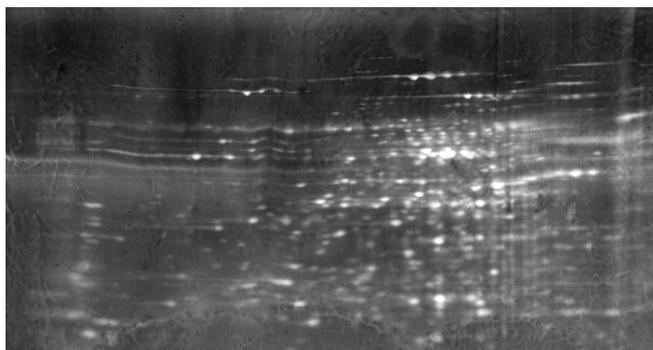


Рис. 5. Картина разделения белков штамма *B. anthracis* СТИ методом 2D-электрофореза.

Экстракция белкового комплекса проводилась из взвеси 20-часовой культуры *B. anthracis* СТИ, предварительно обработанной лизоцимом, в лизирующем буфере с 6 М гуанидина тиоцианатом.

Fig. 5. Protein separation pattern of *B. anthracis* STI strain by 2D electrophoresis.

The protein complex was extracted from a suspension of a 20-hour culture of *B. anthracis* STI, pretreated with lysozyme in lysis buffer with 6 M guanidine thiocyanate.

Поскольку разрешающая способность капиллярного электрофореза недостаточно высока, этот метод может служить только для предварительной оценки образцов, полученных с применением различных схем подготовки культуры и получения лизатов. На конечном этапе оценку эффективности экстракции белков вакцинного штамма СТИ с невысокой скоростью спорообразования (13% при выращивании на LB-агаре в течение 20 ч) проводили методом 2D-электрофореза. На 2D-электрофореграмме (рис. 5) зарегистрирован широкий набор белков, различающихся по значениям изоэлектрических точек (1-е направление) и величине молекулярных масс (2-е направление). Полученное разделение белков позволяет проводить их выделение и идентификацию методом MALDI-TOF/TOF масс-спектрометрии после их экстракции из геля, очистки и трипсинолиза.

Обсуждение

Скорость спорообразования у штаммов *B. anthracis* значительно различается, что является значимым фактором при соблюдении стандартных условий получения вегетативной культуры для протеомного картирования штаммов возбудителя сибирской язвы методом 2D-электрофореза в сочетании с методом MALDI-TOF/TOF масс-спектрометрии.

Анализ результатов различных методов экстракции тотального белкового комплекса выявил влияние индивидуальных свойств штаммов *B. anthracis* на эффективность различных способов пробоподготовки. Так, культура штамма ΔСТИ практически полностью лизировалась под действием лизоцима, в то время как культурам штаммов *B. anthracis* 1(CO) и 1(CO)-5-1 для деструкции бактериальных

клеток требовалось сочетанное действие лизоцима и лизирующих растворов, содержащих хаотропные вещества. Большую чувствительность штамма *B. anthracis* ΔСТИ, вероятно, можно объяснить особой физиологической фазой культуры — естественным лизисом бацилл, завершающим процесс спорообразования. Практически не измененный по сравнению с контролем (свежеприготовленная бактериальная взвесь) вид культур после обработки лизирующими растворами подтверждает данные о том, что хаотропные вещества вызывают деградационные процессы, затрагивающие почти все клеточные структуры. Однако клеточная стенка в основном сохраняет свою целостность, ультраструктуру и ригидность, что обуславливает поддержание исходной морфологии клетки. В этих случаях, несмотря на визуальную целостность клеток, на электрофореграммах наблюдались интенсивные полосы, соответствующие белкам с различной молекулярной массой, хотя и в несколько меньшем количестве, чем при сочетанном воздействии лизоцима и гуанидина тиоцианата.

Предварительная обработка культуры лизоцимом с последующей ее обработкой раствором, содержащим мочевины/тиомочевину, напротив, уменьшала количество белковых фракций на электрофореграмме, чему мы не смогли найти объяснение. Меньшая эффективность экстракции внутриклеточных белков у штамма 1(CO)-24 испытанными методами, возможно, объясняется особенностями поверхностных структур клеток, т.к. данный штамм (вариант) был выделен из популяции исходного штамма 1(CO) по признаку резистентности к сибирезавязному бактериофагу BA-9 и у него отсутствовал плазмиды pXO1.

Меньшее количество полос на электрофореграмме вряд ли можно объяснить отсутствием продукции части белков, синтез которых детерминруется указанной плазмидой, т.к. бесплазмидный штамм ΔСТИ был представлен на электрофореграмме в этих же условиях значительно большим количеством белковых фракций.

Заключение

Протеомное картирование штаммов *B. anthracis* является, безусловно, аналитическим методом их изучения для выявления индивидуальных особенностей и их корреляции с патогенными свойствами или важными для жизнеобеспечения физиологическими механизмами и сравнительного анализа синтеза определенных белков в конкретных условиях. Исходя из этого, ввиду трудоемкости и затратности указанных исследований получение материала для дальнейшего анализа методом 2D-электрофореза должно проводиться с учетом индивидуальных особенностей штаммов, в том числе скорости спорообразования и чувствительности

к действию определенных лизирующих смесей, с подбором оптимальных питательных сред и сроков предварительного культивирования культуры, а также оптимальной схемы экстракции белков. Самым эффективным способом лизиса вегетативной культуры с целью получения наиболее полного комплекса белков является применение лизирующего буфера, содержащего 6 М гуанидина тиоцианата, с предварительной обработкой лизоцимом.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Castanha E.R., Fox A., Fox K.F. Rapid discrimination of *Bacillus anthracis* from other members of the *B. cereus* group by mass and sequence of «intact» small acid soluble proteins (SASPs) using mass spectrometry. *J. Microbiol. Methods*. 2006; 67(2): 230-40. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.03.024>
2. Lasch P., Beyer W., Nattermann H., Stämmeler M., Siegbrecht E., Grunow R., et al. Identification of *Bacillus anthracis*

by using matrix-assisted laser desorption ionization — time of flight mass spectrometry and artificial neural networks. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75(22): 7229-42.

DOI: <http://doi.org/10.1128/AEM.00857-09>

3. Mottaz-Brewer H., Norbeck A., Adkins J., Manes N., Ansong C., Shi L., et al. Optimization of proteomic sample preparation procedures for comprehensive protein characterization of pathogenic systems. *J. Biomol. Tech.* 2008; 19(5): 285-95.
4. Chitlaru T., Shafferman A. Proteomic studies of *Bacillus anthracis*. *Future Microbiol.* 2009; 4(8): 983-98. DOI: <http://doi.org/10.2217/fmb.09.73>
5. Gao Z., Wang Z., Zhang K., Li Y., Zhang T., Wang D., et al. Experimental validation of *Bacillus anthracis* A16R proteogenomics. *Sci. Rep.* 2015; 5: 14608. DOI: <http://doi.org/10.1038/srep14608>
6. Rajoria S., Sabna S., Babele P., Kumar R.B., Kamboj D.V., Kumar S., et al. Elucidation of protein biomarkers for verification of selected biological warfare agents using tandem mass spectrometry. *Sci. Rep.* 2020; 10(1): 2205. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41598-020-59156-3>

Информация об авторах:

Котенева Елена Анатольевна — к.б.н., зав. лаб. постгеномных технологий ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт», 355035, Ставрополь, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4525-1594>.

E-mail: postgenom_stv@mail.ru

Цыганкова Ольга Ивановна — д.м.н., врач-бактериолог лаб. бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт», 355035, Ставрополь, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7940-9460>.

Калинин Александр Васильевич — биолог лаб. постгеномных технологий ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт», 355035, Ставрополь, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2678-2624>.

Родионов Иван Сергеевич — м.н.с. лаб. постгеномных технологий ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт», 355035, Ставрополь, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0049-7411>.

Абрамович Елена Владимировна — м.н.с. лаб. постгеномных технологий ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт», 355035, Ставрополь, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8852-4332>.

ЩербакOVA Виктория Юрьевна — лаборант-исследователь лаб. постгеномных технологий ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт», 355035, Ставрополь, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2982-4877>.

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

Information about the authors:

Elena A. Koteneva — PhD. (Biol.), Head, Laboratory of postgenomic investigations, Stavropol Research Antiplague Institute, 355035, Stavropol, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4525-1594>.

E-mail: postgenom_stv@mail.ru

Olga I. Tsygankova — D. Sci. (Med.), bacteriologist, Brucellosis laboratory, Stavropol Research Antiplague Institute, 355035, Stavropol, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7940-9460>.

Aleksander V. Kalinin — biologist, Laboratory of postgenomic investigations, Stavropol Research Antiplague Institute, 355035, Stavropol, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2678-2624>.

Ivan S. Rodionov — junior researcher, Laboratory of postgenomic investigations, Stavropol Research Antiplague Institute, 355035, Stavropol, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0049-7411>.

Alena V. Abramovich — junior researcher, Laboratory of postgenomic investigations, Stavropol Research Antiplague Institute, 355035, Stavropol, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8852-4332>.

Victoriya Yu. Shcherbakova — assistant, Laboratory of postgenomic investigations, Stavropol Research Antiplague Institute, 355035, Stavropol, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2982-4877>.

Contribution: the authors contributed equally to this article.

ОБЗОРЫ

© Шатунова П.О., Быков А.С., Свитич О.А., Зверев В.В., 2020



Ангиотензинпревращающий фермент 2. Подходы к патогенетической терапии COVID-19

Шатунова П.О.[✉], Быков А.С., Свитич О.А., Зверев В.В.

ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Москва, Россия

Возбудителем коронавирусной инфекции, которая привела к пандемии в 2020 г., является вирус SARS-CoV-2. Он относится к β -коронавирусам и имеет высокое генетическое сходство с вирусом SARS-CoV, вызвавшим вспышку тяжелого острого респираторного синдрома в 2002–2003 г. Анализ межмолекулярных взаимодействий показывает, что SARS-CoV-2 более вирулентен вследствие снижения свободной энергии при связывании с ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2), который является транспортером для вируса в клетку-хозяина. В связи с широким распространением коронавирусной инфекции по всему миру остро встает вопрос о подробном изучении ключевого звена патогенеза заболевания — ACE2. Детальное изучение фермента, который является рецептором на поверхности различных тканей и в норме осуществляет превращение ангиотензина II в ангиотензин (1–7), привело к неоднозначным выводам. Будучи не-тканеспецифичным, рецептор широко распространен в сердце, почках, тонкой кишке, яичках, щитовидной железе, жировой ткани. Помимо прямой барорегулирующей функции он подавляет воспаление, главным образом в легочной ткани, участвует в транспорте аминокислот и поддерживает жизнедеятельность микробиома кишечника. Ввиду существенных положительных функций становится очевидной неоднозначность ACE2, в том числе при коронавирусной инфекции. Перспективным терапевтическим направлением при коронавирусной инфекции может оказаться влияние на ренин-ангиотензиновую систему. Предварительные данные о применении ингибиторов ACE2, препаратов, содержащих данный рецептор в циркуляторной форме, и блокаторов ангиотензинового рецептора II свидетельствуют об их эффективности и, как следствие, улучшении состояния и прогнозов для пациентов с коронавирусной инфекцией. В обзоре представлена информация о распространении ACE2 в различных тканях человека, его взаимодействии с SARS-CoV-2, дано теоретическое обоснование практического применения препаратов, связанных с метаболическим путем ACE2, для лечения и ограничения распространения коронавирусной инфекции.

Ключевые слова: SARS-CoV-2; коронавирусная инфекция; ангиотензин-превращающий фермент 2; АПФ2, COVID-19; блокаторы ангиотензинового рецептора II.

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: Шатунова П.О., Быков А.С., Свитич О.А., Зверев В.В. Ангиотензинпревращающий фермент 2. Подходы к патогенетической терапии COVID-19. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(4): 339–345.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-6>

Поступила 04.06.2020
Принята в печать 16.06.2020

Angiotensin-converting enzyme 2. Approaches to pathogenetic therapy of COVID-19

Polina O. Shatunova[✉], Anatoly S. Bykov, Oksana A. Svitich, Vitaly V. Zverev

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 119991, Moscow, Russia

The SARS-CoV-2 virus is a pathogen causing the coronavirus infection that culminated in a worldwide pandemic in 2020. It belongs to β -coronaviruses and has high genetic similarity to the SARS-CoV virus that is responsible

for an outbreak of severe acute respiratory syndrome in 2002–2003. The analysis of molecular interactions shows that SARS-CoV-2 has higher virulence due to lower binding free energy in interaction with the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), which is used by the virus to enter the host cell. At the time of the global coronavirus pandemic, the thorough study of ACE2 as a key component of the disease pathogenesis comes to the fore. The detailed study of the enzyme, which is a receptor located on the surface of different tissues and which normally catalyzes the conversion of angiotensin II to angiotensin (1–7), led to diverging conclusions. Being non-tissue specific, the receptor is abundantly present in the heart, kidneys, small intestine, testes, thyroid, and adipose tissue. Besides regulating blood pressure, it suppresses inflammation, mainly in the lung tissue, participates in amino acid transport and maintains the activity of the gut microbiome. With all its essential positive functions, the role of ACE2 is highly ambiguous, specifically in coronavirus infection. The influence on the renin-angiotensin system can be seen as a promising therapeutic route in treatment of coronavirus infection. The preliminary data on using of ACE2 inhibitors, soluble forms of ACE2, and angiotensin II receptor blockers demonstrate their effectiveness and, consequently, improvement in symptoms and prognoses for patients with coronavirus infection. The review presents information about ACE2 distribution in human tissues, explores its interaction with SARS-CoV-2, provides a theoretical basis for medications involving ACE2 metabolic pathways and for using them in treatment of coronavirus infection and its prevention.

Keywords: SARS-CoV-2; coronavirus infection; angiotensin-converting enzyme 2; COVID-19; ACE2, angiotensin II receptor blockers..

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: Shatunova P.O., Bykov A.S., Svitich O.A., Zverev V.V. Angiotensin-converting enzyme 2.

Approaches to pathogenetic therapy of COVID-19. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii.* 2020; 97(4): 339–345. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-6>

Received 4 June 2020

Accepted 16 June 2020

Введение

В декабре 2019 г. в Китае произошла вспышка острой респираторной инфекции с такими клиническими проявлениями, как лихорадка, сухой кашель, одышка и пневмония [1]. Возбудителем является новый коронавирус, принадлежащий к β-коронавирусам и имеющий схожие характеристики с вирусом, вызывающим тяжелый острый респираторный синдром (SARS), который являлся пандемическим штаммом в 2002–2003 гг. Новый вирус получил название коронавируса-2 (SARS-CoV-2), а болезнь была названа коронавирусной инфекцией 2019 года (COVID-19). Смертность от COVID-19 повышается в группах пожилых людей (старше 70 лет) и лиц с хроническими заболеваниями (гипертензией, сахарным диабетом, сердечно-сосудистыми нарушениями). Два из вышеперечисленных заболеваний тесно связаны с приемом лекарств, которые действуют в качестве ингибитора рецептора ангиотензинпревращающего фермента (ACE). Они применяются для блокировки ангиотензинового рецептора и, как следствие, снижения артериального давления.

Ученые тщательно исследуют патофизиологические механизмы COVID-19, взаимодействие вируса с легкими и сердцем человека. Согласно нескольким источникам, ACE2, расположенный на альвеолярных эпителиальных клетках, служит котранспортером для SARS-CoV-2 в клетки легких человека. Таким образом, ACE2 является ключом для понимания механизма развития COVID-19.

В данном обзоре представлена информация о распространении ACE2 в различных тканях челове-

ка, его взаимодействии с SARS-CoV-2, дано теоретическое обоснование практического применения препаратов, связанных с метаболическим путем ACE2, для лечения и ограничения распространения COVID-19.

Роль ACE2 в патогенезе COVID-19 SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 — это одноцепочечный РНК-содержащий вирус с похожим на корону S-гликопротеином. Полногеномный сиквенс вируса SARS-CoV-2, показал, что он на 96% схож с SARS-подобным коронавирусом летучих мышей. Также данный вирус на 79,5% идентичен SARS-CoV [2], а некоторые закодированные белки, такие как главная протеиназа коронавируса, папаиноподобная протеиназа и РНК-зависимая РНК-полимераза [3], обладают 96% сходством с SARS-CoV. Ввиду их близкого родства считается, что патогенетические механизмы развития инфекции у SARS-CoV и SARS-CoV-2 действуют по одному принципу.

Для проникновения в клетку хозяина и обеспечения слияния мембраны вируса с мембраной клетки хозяина во время инфицирования SARS-CoV-2 использует поверхностный спайковый гликопротеин (S). S-гликопротеин является тримерным белком. Он играет ключевую роль в обеспечении выживаемости коронавирусов, т.к. не только выступает в качестве важной функциональной части вириона, но и всецело обеспечивает присоединение и слияние с мембранами клетки-хозяина. Кроме того, S-белок, являющийся самым крупным поверхностным

белком коронавируса, определяет растворимость вирусных частиц и, как следствие, контагиозность SARS-CoV-2.

S-белок имеет два важных участка — S1 и S2: S1 связывается с рецептором на поверхности клетки хозяина, а S2 обеспечивает слияние мембран [4]. В S1-участке имеется N-концевой (NTD) и C-концевые домены (CTD1, CTD2 и CTD3). У вируса SARS-CoV на CTD1 располагается рецепторсвязывающий домен (RBD).

Коронавирус SARS-CoV-2 проявляет высокую степень гомологичности к SARS-CoV [5]. Он проникает в клетку-хозяина с помощью взаимодействия между S-белком вируса и ACE2 человека. Однако молекулярный механизм данной связи, как и эволюция SARS-CoV-2, остаются не до конца изученными.

Было доказано, что S-гликопротеин SARS-CoV-2 обладает меньшей свободной энергией по сравнению с SARS-CoV [5]. Данное наблюдение подчеркивает, что SARS-CoV-2 является более стабильным и меньше подвержен разрушению при повышенных температурах — следовательно, SARS-CoV-2 имеет более высокую персистирующую способность, чем SARS-CoV при такой же температуре.

На S-белке у коронавируса расположен RBD — крайне важный для жизнедеятельности вируса домен, обеспечивающий инфицирование. Интересно, что свободная энергия RBD у SARS-CoV-2 оказалась ниже, чем у SARS-CoV, как и его энергия сольватации. Дело в том, что для связи RBD с ACE2 он должен отсоединиться от S-гликопротеина и раствориться в воде. Другими словами, SARS-CoV-2 становится более растворимым, и в этом случае взаимодействие с ACE2 происходит гораздо легче.

Снижение свободной энергии S-гликопротеина и энергии сольватации RBD у SARS-CoV-2 может быть следствием эволюции вируса или адаптации к организму хозяина, поскольку обычно природным резервуаром для SARS-подобных коронавирусов являются летучие мыши, у которых температура тела в норме выше, чем у людей [6].

Говоря о RBD SARS-CoV-2, необходимо упомянуть еще одну важную особенность — он более гибкий, чем аналогичный участок вируса SARS-CoV. Иными словами, для связи с ACE2 он должен преодолеть большую энтропию, а значит, при повышении температуры комплекс RBD-ACE2 становится нестабильным. Эта деталь позволяет надеяться на снижение темпов роста пандемии при наступлении жаркой погоды.

При сравнении комплексов, которые образуют анализируемые вирусы с ACE2, выяснилось, что SARS-CoV-2 связывается с ферментом с более высокой аффинностью. Мутационные адаптивные изменения в SARS-CoV-2 относительно SARS-CoV могут служить разгадкой высокой контаги-

озной способности и широкого распространения COVID-19.

Строение и функции ACE2

Человеческая карбоксипептидаза ACE2 кодируется геном *ACE2*, расположенным на 22-й хромосоме [7]. ACE2 представляет собой трансмембранный белок I типа, имеющий внеклеточный N-гликозилированный N-концевой участок, на котором находится карбоксипептидазный сайт, а также короткий внутриклеточный C-концевой цитоплазматический хвост [8]. N-концевой пептидазный домен является местом связи ACE2 с SARS-CoV. Также выделяют две формы белка ACE2: клеточную (связанную с мембраной) и циркулирующую (растворимую). Клеточная форма — это полноценный белок, синтезируемый в больших количествах пневмоцистами или энтероцитами тонкой кишки.

Циркулирующая форма (у нее сохраняется N-концевой пептидазный участок) возникает после расщепления клеточной формы ACE2 металлопротеазой ADAM17, после чего она попадает в межклеточное пространство [8]. Напротив, взаимодействие ACE2 с трансмембранной сериновой протеазой II типа TMPRSS2 обеспечивает вход SARS-CoV-2 в клетки — мишени легочной ткани и тонкой кишки. TMPRSS2-путь расщепления может ингибировать ADAM17-путь. TMPRSS2 связывается с ADAM17 для диссоциации комплекса ADAM17-ACE2. Как ADAM17, так и TMPRSS2 отщепляют от ACE2 небольшой C-концевой фрагмент. Именно это служит началом проникновения вируса SARS-CoV в клетку.

Несмотря на схожесть генов *ACE* и *ACE2*, белки ACE и ACE2 выполняют различные функции в организме человека. Так, ACE отщепляет от субстрата по одной аминокислоте, действуя как карбоксипептидаза, в то время как ACE2 гидролизует связь между белковым остовом и дипептидом с C-конца субстрата. ACE и ACE2 являются незаменимыми компонентами ренин-ангиотензиновой системы (RAS), задачи которой — поддержание гомеостаза сердечно-сосудистой системы и функционирования различных органов, регуляция систолического давления, осмотического и электролитного баланса.

Ангиотензиноген синтезируется в печени, после чего преобразуется ренином в ангиотензин I (AngI), а затем при участии ACE — в AngII. AngII — это ключевое звено RAS, он связывается с ангиотензиновым рецептором I типа (AT1R). Это взаимодействие приводит к сокращению гладкой мускулатуры бронхов, пролиферации фибробластов в легких, апоптозу альвеолярных эпителиальных клеток, повышению проницаемости сосудов в легочной ткани, а также к острому респираторному дистресс-синдрому [9]. Тем временем ACE2

выступает в качестве контррегулятора активности комплекса ACE–AngII–AT1R, он гидролизует AngII в Ang1–7, который, взаимодействуя через Mas-рецептор, вызывает вазодилатацию, снижение артериального давления и индукцию апоптоза. Схожая защитная функция наблюдается при связывании AngII с рецептором AT2R. Кроме того, ACE2 может взаимодействовать с AngI, превращая его в Ang1–9, из которого возможен переход в Ang1–7 при участии ACE. Также, выступая в качестве партнера для транспортера аминокислот B0AT1, ACE2 принимает участие в абсорбции нейтрально заряженных аминокислот в кишечнике [9].

ACE2 в больших количествах экспрессируется в альвеолярных эпителиальных клетках I и II типов, эндотелиальных клетках сосудов, гладкомышечных клетках легочной ткани [10]. Коронавирус может проникать в организм человека различными способами. Самым распространенным считается аэрогенный механизм передачи, при котором у заболевшего человека появляются симптомы тяжелой пневмонии. Однако было установлено, что ACE2 содержится в больших количествах в тонкой кишке, яичках, почках, сердце, щитовидной железе, жировой ткани. В меньшей концентрации его обнаруживают в печени, толстом кишечнике, мочевом пузыре и надпочечниках.

Структурное моделирование показало, что комплекс ACE2–B0AT1 может связываться с S-белком вируса SARS-CoV-2. Таким образом, SARS-CoV-2 может проникать в организм человека через другие ткани и органы, минуя респираторный тракт [11]. Об этом свидетельствуют недавние исследования, показывающие наличие SARS-CoV-2 в стуле зараженных пациентов, а также развитие заболевания без пневмонии или с добавочными симптомами, не связанными с респираторным трактом. В данном случае у больных наблюдаются симптомы заражения желудочно-кишечного тракта: диарея, тошнота, рвота, а также спутанность сознания, головная боль и инфекционные поражения сердца [12–14].

Наличие ACE2 в яичках и тестикулярных сосудах указывает на большую восприимчивость к COVID-19 у мужчин. Гендерных, возрастных или расовых различий в концентрации ACE2 в тканях организма человека не выявлено, тем не менее риск смертности повышается для мужчин по сравнению с женщинами и для пожилых людей относительно более молодого поколения. Это связано с возрастными и функциональными особенностями механизмов врожденного и адаптивного иммунитета, способностью SARS-CoV-2 вызывать цитокиновый шторм, который приводит к иммунопатологическим нарушениям у пациентов с коронавирусной инфекцией. Различное количество клеток иммунной системы в легочной ткани способно по-разному противостоять инфекции и аутоповреждению. Уста-

новлено, что у женщин (рассматривая гендерные группы) и у людей молодого возраста (рассматривая две возрастные группы до и после 49 лет) те клетки легочной ткани, которые экспрессировали ACE2 в большем количестве, легче инфицировались вирусом SARS-CoV, при этом клеток иммунной системы в данном случае обнаруживалось меньше, чем в аналогичных тканях со средней экспрессией ACE2. Для пожилых лиц и лиц мужского пола характерна обратная зависимость — при высокой экспрессии ACE2 наблюдается рост числа иммунных клеток в легочной ткани. Это означает, что при инфицировании SARS-CoV и SARS-CoV-2 у этих людей с большей вероятностью будут наблюдаться аутоагрессия и цитокиновый шторм, что существенно отягощает течение болезни.

ACE2 и коронавирусная инфекция

COVID-19 представляет собой заболевание, поражающее нижние дыхательные пути [15]. При вскрытии трупов людей, болевших COVID-19, обнаружены массивные поражения легких с фиброзными и экссудативными изменениями. При этом мокрота и экссудат заполняли нижние дыхательные пути и альвеолы. По сравнению с воздействием SARS-CoV, при SARS-CoV-2 экссудативных поражений наблюдается больше, но фиброз протекает в более легкой форме. Наличие у трупов сегментальной дилатации и стеноза тонкой кишки подчеркивает развитие инфекционного процесса в данном органе. Поражений иных органов и тканей не выявлено. Исследование, проведенное с другими заболевшими [12], указывает на присутствие у них билатерального диффузного поражения альвеол с фибромукоидным экссудатом, десквамацией пневмоцитов и формированием гиалиновой мембраны в легких.

Если иммунная система не в состоянии справиться с SARS-CoV-2, то вирус активно реплицируется с использованием внутриклеточного ACE2 и затем при выходе во внеклеточное пространство разрушает клетку-хозяина. Как следствие, метаболический путь ангиотензина не ингибируется. Это обстоятельство только усугубляет инфекционный процесс и развитие воспаления, а цитокиновый шторм нарушает функционирование не только респираторного тракта, но и сердечно-сосудистой и иных систем органов. Для людей с такими хроническими заболеваниями, как артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца и сахарный диабет, крайне опасно инфицирование SARS-CoV-2 — при этих заболеваниях метаболический путь ангиотензина является избыточным, а приобретение коронавирусной инфекции серьезно усугубляет течение сопутствующих заболеваний и с большей вероятностью может привести к тяжелым состояниям и даже к смерти.

ACE2 играет значимую роль во многих патологических и физиологических состояниях. Установлено, что мыши, зараженные вирусом SARS-CoV, испытывают недостаток ACE2, у них повышается уровень AngII и развиваются тяжелые заболевания органов дыхания [16]. Отсутствие ACE2, обеспечивающего протективную функцию, ведет к дисфункции RAS и острым патологическим респираторным состояниям. Интересно, что защитная функция ACE2 при острых поражениях легких наблюдается не только при инфицировании коронавирусом. У лабораторных мышей, имеющих массивный отек легких, тяжелейшую гипоксию, гиалиноз и воспалительные клеточные инфильтраты, при введении рекомбинантного ACE2 наблюдалось восстановление легочной ткани. Также ACE2 защищает от избыточного воспаления при заражении птичьим гриппом. При данном состоянии тяжесть заболевания, его прогрессирование и летальность находятся в прямой зависимости от уровня AngII в плазме крови.

Наличие ACE2 в нереспираторных органах оказывает положительный эффект на функционирование данных тканей. У лабораторных мышей с эндогенной недостаточностью ACE2 наблюдаются тяжелые поражения сердца — снижение сократительной способности за счет незначительной венстрикулярной дилатации и истончения стенки левого желудочка [9].

Концентрация ACE2 может увеличиваться после ишемического инсульта. Это компенсаторная реакция, направленная на устранение избытка Ang1–7 и обеспечение защитных эффектов путем уравновешивания AngII.

ACE2 участвует в патологических процессах почечной ткани, хотя точный механизм еще не установлен. У мышей с недостаточностью ACE2 развиваются гломерулосклероз и альбуминурия [17]. Снижение концентрации ACE2 вызывает дисбаланс AngII, который участвует в почечном воспалении и фиброзе, объясняя, по крайней мере частично, прогрессирующее поражение почек.

Важной непептидазной функцией ACE2 является участие в транспорте аминокислот через стенку тонкого кишечника. Одной из таких аминокислот является триптофан, регулирующий секрецию антимикробных пептидов, которые влияют на состав кишечного микробиома. Это объясняет наличие колита у мышей с недостаточностью ACE2, у которых происходит нарушение транспорта триптофана и его недостаток ведет к дисбактериозу и воспалению.

Несмотря на проведение интенсивной терапии, смертность от COVID-19 по-прежнему остается на высоком уровне. Изобретение вакцины — к сожалению, крайне трудоемкий и длительный процесс. Кроме того, SARS-CoV-2 мутирует в каждом репликационном цикле. Это существенно осложняет

разработку вакцины, а при определенном исходе и вовсе может сделать ее бесполезной. Лекарственные препараты, направленные на регулирование дисбаланса RAS, теоретически можно использовать в иных целях. Например, для блокирования сайта связывания SARS-CoV-2 с ACE2 возможно применение растворимой формы ACE2, которая, связываясь с RBD вируса, будет ингибировать его проникновение в клетку. Кроме того, ACE2 уменьшит развитие патологических изменений, участвуя в различных протективных метаболических путях.

Сериновая протеаза TMPRSS2 играет ключевую роль в клеточном проникновении SARS-CoV-2 и дисфункции ACE2, поэтому блокировка данного фермента может служить для предотвращения тяжелых критических осложнений COVID-19. Установлено, что ингибитор TMPRSS2 камостат мезилат частично блокирует TMPRSS2-ACE2-опосредованный вход SARS-CoV-2 в клетку [18]. В то же время нафамостат мезилат, являющийся ингибитором мембранного слияния мембран клетки-хозяина и SARS-CoV-2, показывает десятикратную эффективность относительно камостат мезилата. Оба препарата обладают доказанной безопасностью для клинического применения, поэтому могут использоваться для лечения COVID-19 в медицинских организациях. Нафамостат мезилат имеет еще одно свойство — он блокирует протеолиз фибриногена и его переход в фибрин. При коронавирусной инфекции наблюдается увеличение в сыворотке крови уровня D-димера — продукта деградации фибрина, а его концентрация более 1 мг/мл ассоциирована с высоким риском смерти пациентов с COVID-19. Таким образом, нафамостат мезилат потенциально является препаратом двойного действия — он не только блокирует входение вируса SARS-CoV-2 в клетку, но и предотвращает тромбоз и синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания. В Японии в марте 2020 г. начались клинические испытания данного препарата для лечения коронавирусной инфекции.

Ингибиторы ACE, блокаторы рецептора AngII, агонисты Mas, возможно, позволят скорректировать нарушения RAS. Блокаторы рецептора AngII приобретают доверие благодаря доказанной функции облегчения симптомов поражения легочной ткани под действием SARS и вируса птичьего гриппа. Ожидается, что блокирование рецепторов Ang — более надежный способ, чем применение ингибиторов ACE, т.к. AngII может синтезироваться различными ферментами. Важно отметить, что препараты с указанным действием терапевтически безопасны и часто применяются. Парадоксально, но, исходя из клинических данных [19], увеличение экспрессии ACE на фоне приема этих лекарственных препаратов не приводит к возрастанию вирулентности SARS-CoV-2. Исследования вируса иммунодефицита че-

ловека (HIV) показали, что повышенная экспрессия HIV-связывающих сайтов CCR5 и CD4 защищает пациентов от вирулентности вируса. HIV избегает суперинфекции во время процесса попадания в клетку посредством уменьшения количества CCR5. Данное снижение способствует эффективной репликации вируса и, как следствие, влияет на патогенетические механизмы синдрома приобретенного иммунодефицита. Остается неясным, применима ли данная концепция для SARS-CoV-2, однако, если коронавирус использует такой же механизм, применение блокаторов рецептора AngII и ACEI вполне обоснованно.

Заключение

Важные мутационные изменения в геноме вируса SARS-CoV привели к появлению более сильного вида SARS-CoV-2 и развитию пандемии в 2020 г. ACE2, с одной стороны, играет ключевую роль в проникновении вируса в клетку-хозяина, а с другой стороны, защищает организм человека от тяжелых поражений внутренних органов при коронавирусной инфекции. Разработка вакцины против вируса, который претерпевает множество мутаций, остается длительным и трудоемким процессом. Зная роль ACE2 в RAS, становится возможным применение лекарственных средств, воздействующих на данный метаболический путь, для лечения COVID-19.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Wu F., Zhao S., Yu B., Chen Y.M., Wang W., Song Z.G., et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020; 579(7798): 265-9. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>
2. Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., Hu B., Zhang L., Zhang W., et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020; 579(7798): 270-3. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
3. Morse J.S., Lalonde T., Xu S., Liu W.R. Learning from the past: possible urgent prevention and treatment options for severe acute respiratory infections caused by 2019-nCoV. *Chembiochem*. 2020; 21(5): 730-8. DOI: <http://doi.org/10.1002/cbic.202000047>
4. Song W., Gui M., Wang X., Xiang Y. Cryo-EM structure of the SARS coronavirus spike glycoprotein in complex with its host cell receptor ACE2. *PLoS Pathog*. 2018; 14(8): e1007236. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007236>
5. He J., Tao H., Yan Y., Huang S.Y., Xiao Y. Molecular Mechanism of Evolution and Human Infection with SARS-CoV-2. *Viruses*. 2020; 12(4): 428. DOI: <http://doi.org/10.3390/v12040428>
6. Banerjee A., Kulcsar K., Misra V., Frieman M., Mossman K. Bats and coronaviruses. *Viruses*. 2019; 11(1): 41. DOI: <http://doi.org/10.3390/v11010041>
7. Tipnis S.R., Hooper N.M., Hyde R., Karran E., Christie G., Turner A.J. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J. Biol. Chem*. 2000; 275(43): 33238-43. DOI: <http://doi.org/10.1074/jbc.M002615200>
8. Lambert D.W., Yarski M., Warner F.J., Thornhill P., Parkin E.T., Smith A.I., et al. Tumor necrosis factor-alpha convertase (ADAM17) mediates regulated ectodomain shedding of the severe-acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) receptor, angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2). *J. Biol. Chem*. 2005; 280(34): 30113-9. DOI: <http://doi.org/10.1074/jbc.M505111200>
9. Hamming I., Cooper M.E., Haagmans B.L., Hooper N.M., Korstanje R., Osterhaus A.D., et al. The emerging role of ACE2 in physiology and disease. *J. Pathol*. 2007; 212(1): 1-11. DOI: <http://doi.org/10.1002/path.2162>
10. Li M.Y., Li L., Zhang Y., Wang X.S. Expression of the SARS-CoV-2 cell receptor gene ACE2 in a wide variety of human tissues. *Infect. Dis. Poverty*. 2020; 9(1): 45. DOI: <http://doi.org/10.1186/s40249-020-00662-x>
11. Li W., Moore M.J., Vasileva N., Sui J., Wong S.K., Berne M.A., et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*. 2003; 426(6965): 450-4. DOI: <http://doi.org/10.1007/s00018-004-4242-5>
12. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y., et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020; 395(10223): 497-506. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
13. Chen N., Zhou M., Dong X., Qu J., Gong F., Han Y., et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*. 2020; 395(10223): 507-13. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7)
14. Holshue M.L., DeBolt C., Lindquist S., Lofy K.H., Wiesman J., Bruce H., et al. First case of 2019 novel coronavirus in the United States. *N. Engl. J. Med*. 2020; 382(10): 929-36. DOI: <http://doi.org/10.1056/NEJMoa2001191>
15. Yan T., Xiao R., Lin G. Angiotensin-converting enzyme 2 in severe acute respiratory syndrome coronavirus and SARS-CoV-2: A double-edged sword? *FASEB J*. 2020; 34(5): 6017-26. DOI: <http://doi.org/10.1096/fj.202000782>
16. Kuba K., Imai Y., Rao S., Gao H., Guo F., Guan B., et al. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat. Med*. 2005; 11(8): 875-9. DOI: <http://doi.org/10.1038/nm1267>
17. Ye M., Wysocki J., William J., Soler M.J., Cokic I., Batlle D. Glomerular localization and expression of Angiotensin-converting enzyme 2 and Angiotensin-converting enzyme: implications for albuminuria in diabetes. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2006; 17(11): 3067-75. DOI: <http://doi.org/10.1681/ASN.2006050423>
18. Xiao L., Sakagami H., Miwa N. ACE2: The key molecule for understanding the pathophysiology of severe and critical conditions of COVID-19: demon or angel? *Viruses*. 2020; 12(5): 491. DOI: <http://doi.org/10.3390/v12050491>
19. Rico-Mesa J.S., White A., Anderson A.S. Outcomes in patients with COVID-19 infection taking ACEI/ARB. *Curr. Cardiol. Rep*. 2020; 22(5): 31. DOI: <http://doi.org/10.1007/s11886-020-01291-4>

Информация об авторах:

Шатунова Полина Олеговна[✉] — студент ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7478-8783>.
E-mail: ppolite@mail.ru

Information about the authors:

Polina O. Shatunova[✉] — student, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 119991, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7478-8783>.
E-mail: ppolite@mail.ru

Быков Анатолий Сергеевич — д.м.н., проф. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8099-6201>.

Свитич Оксана Анатольевна — д.м.н., член-корреспондент РАН, проф. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>.

Зверев Виталий Васильевич — д.б.н., академик РАН, зав. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5808-2246>.

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

Anatoly S. Bykov — D. Sci. (Med.), Prof., Department of Microbiology, Virology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 119991, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8099-6201>.

Oksana A. Svitich — D. Sci. (Med.), Corresponding Member of RAS, Prof., Department of Microbiology, Virology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 119991, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>.

Vitaly V. Zverev — D. Sci. (Biol.), Full Member of RAS, Head, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 119991, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5808-2246>.

Contribution: the authors contributed equally to this article.

REVIEWS

© Shatunova P.O., Bykov A.S., Svitich O.A., Zverev V.V., 2020



Angiotensin-converting enzyme 2. Approaches to pathogenetic therapy of COVID-19

Polina O. Shatunova[✉], Anatoly S. Bykov, Oksana A. Svitich, Vitaly V. Zverev

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 119991, Moscow, Russia

The SARS-CoV-2 virus is a pathogen causing the coronavirus infection that culminated in a worldwide pandemic in 2020. It belongs to β -coronaviruses and has high genetic similarity to the SARS-CoV virus that is responsible for an outbreak of severe acute respiratory syndrome in 2002–2003. The analysis of molecular interactions shows that SARS-CoV-2 has higher virulence due to lower binding free energy in interaction with the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), which is used by the virus to enter the host cell. At the time of the global coronavirus pandemic, the thorough study of ACE2 as a key component of the disease pathogenesis comes to the fore. The detailed study of the enzyme, which is a receptor located on the surface of different tissues and which normally catalyzes the conversion of angiotensin II to angiotensin (1–7), led to diverging conclusions. Being non-tissue specific, the receptor is abundantly present in the heart, kidneys, small intestine, testes, thyroid, and adipose tissue. Besides regulating blood pressure, it suppresses inflammation, mainly in the lung tissue, participates in amino acid transport and maintains the activity of the gut microbiome. With all its essential positive functions, the role of ACE2 is highly ambiguous, specifically in coronavirus infection. The influence on the renin-angiotensin system can be seen as a promising therapeutic route in treatment of coronavirus infection. The preliminary data on using of ACE2 inhibitors, soluble forms of ACE2, and angiotensin II receptor blockers demonstrate their effectiveness and, consequently, improvement in symptoms and prognoses for patients with coronavirus infection. The review presents information about ACE2 distribution in human tissues, explores its interaction with SARS-CoV-2, provides a theoretical basis for medications involving ACE2 metabolic pathways and for using them in treatment of coronavirus infection and its prevention.

Keywords: ACE2; angiotensin-converting enzyme 2; SARS-CoV-2; coronavirus infection; angiotensin-converting enzyme; COVID-19; angiotensin II receptor blockers.

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: Shatunova P.O., Bykov A.S., Svitich O.A., Zverev V.V. Angiotensin-converting enzyme 2. Approaches to pathogenetic therapy of COVID-19. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(4): 339–344.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-6>

Received 4 June 2020

Accepted 16 June 2020

Ангиотензинпревращающий фермент 2. Подходы к патогенетической терапии COVID-19

Шатунова П.О.[✉], Быков А.С., Свитич О.А., Зверев В.В.

ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Москва, Россия

Возбудителем коронавирусной инфекции, которая привела к пандемии в 2020 г., является вирус SARS-CoV-2. Он относится к β -коронавирусам и имеет высокое генетическое сходство с вирусом SARS-CoV, вызвавшим вспышку тяжелого острого респираторного синдрома в 2002–2003 гг. Анализ межмолекулярных взаимодействий показывает, что SARS-CoV-2 более вирулентен вследствие снижения свободной энергии при связывании с ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2), который является транспортером для вируса в клетку-хозяина. В связи с широким распространением коронавирусной инфекции по всему миру остро встает вопрос о подробном изучении ключевого звена патогенеза заболевания — ACE2. Детальное

изучение фермента, который является рецептором на поверхности различных тканей и в норме осуществляет превращение ангиотензина II в ангиотензин (1–7), привело к неоднозначным выводам. Будучи не тканеспецифичным, рецептор широко распространен в сердце, почках, тонкой кишке, яичках, щитовидной железе, жировой ткани. Помимо прямой барорегулирующей функции он подавляет воспаление, главным образом в легочной ткани, участвует в транспорте аминокислот и поддерживает жизнедеятельность микробиома кишечника. Ввиду существенных положительных функций становится очевидной неоднозначность ACE2, в том числе при коронавирусной инфекции. Перспективным терапевтическим направлением при коронавирусной инфекции может оказаться влияние на ренин-ангиотензиновую систему. Предварительные данные о применении ингибиторов ACE2, препаратов, содержащих данный рецептор в циркуляторной форме, и блокаторов ангиотензинового рецептора II свидетельствуют об их эффективности и, как следствие, улучшении состояния и прогнозов для пациентов с коронавирусной инфекцией. В обзоре представлена информация о распространении ACE2 в различных тканях человека, его взаимодействии с SARS-CoV-2, дано теоретическое обоснование практического применения препаратов, связанных с метаболическим путем ACE2, для лечения и ограничения распространения коронавирусной инфекции.

Ключевые слова: ACE2; ангиотензин-превращающий фермент 2; SARS-CoV-2; коронавирусная инфекция; COVID-19; блокаторы ангиотензинового рецептора II.

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: Шатунова П.О., Быков А.С., Свитич О.А., Зверев В.В. Ангиотензинпревращающий фермент 2. Подходы к патогенетической терапии COVID-19. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(4): 339–344.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-6>

Поступила 04.06.2020

Принята в печать 16.06.2020

Introduction

In December 2019, China reported an outbreak of acute respiratory infection accompanied by such symptoms as fever, dry cough, shortness of breath and pneumonia [1]. The infection was caused by the novel coronavirus belonging to β -coronaviruses and having common features with the virus causing severe acute respiratory syndrome (SARS), which was a pandemic strain in 2002–2003. The novel virus was named coronavirus-2 (SARS-CoV-2) and the disease was referred to as coronavirus infection 2019 (COVID-19). The COVID-19 death rate tends to increase in groups of elderly people (over 70 years) and people with chronic health conditions (hypertension, diabetes, cardiovascular diseases). Two of the above listed diseases are closely associated with administered medications acting as inhibitors of the receptor of the angiotensin-converting enzyme (ACE). They are used to block the angiotensin receptor and, consequently, to lower blood pressure.

Scientists thoroughly study pathophysiological mechanisms of COVID-19, the interaction of the virus with the human lungs and heart. According to different sources, ACE2 located on alveolar epithelial cells serves as a co-transporter for SARS-CoV-2, helping it enter human lungs. Therefore, ACE2 is the key to understanding the COVID-19 pathogenesis.

The review presents information about ACE2 distribution in human tissues, explores its interaction with SARS-CoV-2, provides a theoretical basis for medications involving ACE2 metabolic pathways and for using them in treatment of COVID-19 and its prevention.

Role of ACE2 in COVID-19 pathogenesis

SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 is a single-stranded RNA virus with a crown-like appearance of spike glycoproteins (S proteins). The whole-genome sequence of the SARS-CoV-2 virus revealed that it is 96% identical to the SARS-like coronavirus found in bats. Besides, this virus is 79.5% identical to SARS-CoV [2], while some encoded proteins like coronavirus main proteinase, papain-like protease and RNA-dependent RNA polymerase [3] show 96% identity to SARS-CoV. Their close relationship suggests that pathogenic mechanisms of infection progression both in SARS-CoV and SARS-CoV-2 are based on the same principle.

The SARS-CoV-2 virus uses the surface spike (S) glycoprotein to enter the host cell and to mediate the host cell and viral membrane fusion during infection. The S-glycoprotein is a trimeric protein. It is essential for survival of coronaviruses, as it not only acts as an important component of the virion, but also is responsible for attachment and fusion with host cell membranes. In addition, the S-protein is the major surface protein of coronaviruses; it determines the solubility of virus particles and, consequently, contagiousness of SARS-CoV-2.

The S-protein is composed of two subunits, S1 and S2; the S1 subunit binds to host receptors and the S2 subunit facilitates membrane fusion [4]. The S1 subunit contains an N-terminal (NTD) and C-terminal domains (CTD1, CTD2 and CTD3). The receptor-binding domain (RBD) is located in CTD1 of the SARS-CoV virus.

The SARS-CoV-2 coronavirus is highly homologous to the SARS-CoV virus [5]. It penetrates the host cell through interaction between the S-protein of the virus and ACE2 of a human. However, the underlying molecular mechanism of this relationship as well as the evolution of SARS-CoV-2 need further study.

It was proved that the S-glycoprotein of SARS-CoV-2 has a significantly lower free energy than SARS-CoV [5]. This observation implies that SARS-CoV-2 is more stable and is not as easily destroyed at warmer temperatures, which means that SARS-CoV-2 has stronger persistence than SARS-CoV at the same temperature.

S-protein has RBD domain that is important for activity of the coronavirus, as it is critical for infection. Interestingly, the RBD free energy and solvation energy in SARS-CoV-2 are lower than in SARS-CoV. The fact is that RBD must move away from the S-glycoprotein and get dissolved in water in order to bind to ACE2. In other words, SARS-CoV-2 becomes more soluble so that it can bind to ACE2 more easily.

The lower free energy of the S-glycoprotein and lower RBD solvation energy in SARS-CoV-2 can result from the evolution of the virus or its adaptation to the host organism; normally bats serve as natural reservoirs for SARS-like coronaviruses, as their body temperature is consistently higher than the temperature in humans [6].

RBD of SARS-CoV-2 has another distinctive feature: It exhibits significantly higher flexibility than RBD of SARS-CoV. In other words, it must overcome a higher entropy penalty in order to bind to ACE2 and, therefore, the RBD-ACE2 complex loses its stability at higher temperatures. The latter gives hope that the pandemic rates will go down when the weather gets warmer.

It was found that SARS-CoV-2 can bind to the human enzyme with a higher binding affinity than SARS-CoV. Adaptive mutations in SARS-CoV-2 as compared to SARS-CoV can provide explanation of the higher infection ability of SARS-CoV-2 and wide spread of COVID-19.

ACE2: Structure and function

The human carboxypeptidase ACE2 is encoded by the *ACE2* gene located on chromosome 22 [7]. ACE2 is a type I transmembrane protein comprised of an extracellular N-glycosylated N-terminal domain containing a carboxypeptidase site and a short intracellular C-terminal cytoplasmic tail [8]. The N-terminal peptidase domain is also an ACE2 and SARS-CoV binding site. There are two forms of ACE2 protein: cellular (membrane-bound) and circulating (soluble). The cellular form is a full-length protein, which is expressed abundantly in pneumocytes and enterocytes of the small intestine.

The circulating form (with the N-terminal peptidase domain) is cleaved from the cellular ACE2 form

by the ADAM17 metalloprotease and then released into the extracellular environment [8]. On the other hand, the interaction of ACE2 with the type II transmembrane serine protease, TMPRSS2, helps SARS-CoV-2 enter target cells of lung tissue and small intestine. The TMPRSS2-cleavage path can inhibit the ADAM17-cleavage path. TMPRSS2 binds to ADAM17 to dissociate the ADAM17-ACE2 complex. Both ADAM17 and TMPRSS2 cleave a short C-terminal fragment from ACE2, thus facilitating the entry of the SARS-CoV virus into the cell.

Despite the similarity between *ACE* and *ACE2* genes, ACE and ACE2 proteins function differently in the human body. For example, ACE cleaves a single amino acid from the substrate, acting as carboxypeptidase, while ACE2 hydrolyzes the bond between the protein backbone and the C-terminal dipeptide. ACE and ACE2 are key components of the renin-angiotensin system (RAS) playing a critical role in maintaining the homeostasis of the cardiovascular system and functions of different organs as well as in regulating the systolic blood pressure, fluid and electrolyte balance.

The angiotensinogen is synthesized in the liver and then is cleaved by renin to form angiotensin I (AngI), which is further converted to angiotensin II (AngII) by ACE. AngII is a key player of RAS; it binds to the angiotensin type I receptor (AT1R), thus inducing contraction of bronchial smooth muscles, proliferation of lung fibroblasts, alveolar epithelial cell apoptosis, increased pulmonary vascular permeability, and acute respiratory distress syndrome [9]. In the meantime, ACE2 acts as a counter-regulator of the activities of the ACE-AngII-AT1R axis; it hydrolyzes AngII into Ang(1-7), which, mediating through the Mas-receptor, causes vasodilation, a decrease in the arterial pressure and induction of apoptosis. The similar protective function can be observed when AngII binds to the AngII receptor. Besides, ACE2 can interact with AngI and convert it to Ang(1-9), which can be converted to Ang(1-7) with the help of ACE. Acting as a partner for the B0AT1 amino acid transporter, ACE2 participates in the intestinal absorption of neutral amino acids [9].

ACE2 is highly expressed in type I and II alveolar epithelial cells, in vascular endothelial cells, and in pulmonary smooth muscle cells [10]. The coronavirus can enter the human body in different ways, the most common of which is the aerogenic mechanism of transmission, when the infected person develops symptoms of severe pneumonia. On the other hand, high ACE levels were found in the small intestine, testes, kidneys, heart, thyroid, and adipose tissue. ACE is present in lower concentrations in the liver, colon, bladder and adrenal glands.

The structural modelling has demonstrated that the ACE2-B0AT1 complex can bind to the S-protein of the SARS-CoV-2 virus. Thus, SARS-CoV 2 can enter

the human body through other tissues and organs, bypassing the respiratory tract [11]. This fact is supported by recent studies that revealed the presence of SARS-CoV-2 in feces of infected patients and by the disease development without pneumonia or with other symptoms unrelated to the respiratory tract. Then, patients develop gastrointestinal symptoms: diarrhea, nausea, vomiting as well as confusion, headache and cardiac involvement [12–14].

The ACE2 presence in testes and testicular vessels suggests that males may be more susceptible to COVID-19. Although no gender, age or race-related differences have been found in ACE2 concentration levels in the human body, males and older adults face a higher risk of death than females and younger adults, respectively. It can be explained by age and functional characteristics of innate and adaptive immune mechanisms and by the ability of SARS-CoV-2 to cause a cytokine storm, which leads to immunopathological events in patients with coronavirus infection. Different numbers of lung-tissue-resident immune cells fight off infection and auto-damage differently. It was found that in females (gender groups) and in younger adults (two age groups of under and over 49 years), the lung-tissue cells that expressed high levels of ACE2 were infected by SARS-CoV more easily, and there were fewer immune cells than in the similar tissues with medium expression of ACE2. Older people and males demonstrate the opposite relationship – the higher expression of ACE2 and an increasing number of immune cells in the lung tissue. It means that if infected with SARS-CoV and SARS-CoV-2, these people are most likely to have auto-aggression and a cytokine storm, which can aggravate the disease progression.

ACE2 and coronavirus infection

COVID-19 is a disease, which affects the lower respiratory tract [15]. The anatomic pathology reports indicated that people who died from COVID-19 had seriously injured lungs with fibrosis and exudative lesions. Phlegm and exudates filled up the lower respiratory tract and alveoli. Compared to SARS-CoV, exudative lesions were significantly more severe, but fibrosis was much milder in SARS-CoV-2. The segmental dilatation and stenosis of the small intestine in the cadavers suggest the development of an infection process in this organ. Lesions of other organs and tissues were not found. The pathological findings obtained from other COVID-19 victims [12] showed bilateral diffuse alveolar damage with fibromyxoid exudates, desquamation of pneumocytes and hyaline membrane formation in the lungs.

If the immune system is not able to defeat SARS-CoV-2, the virus will be massively replicated, will occupy cellular ACE2 and then will destroy the host cells when released to the extracellular space. As a consequence, the metabolic pathway of the angiotensin is not

inhibited. It results in aggravation of the infection process and development of inflammation. The cytokine storm disrupts functioning of the respiratory tract, cardiovascular system as well as other systems and organs. Patients with such underlying diseases as hypertension, coronary heart disease and diabetes are at high risk when infected with SARS-CoV-2: With these diseases, the metabolic pathway of angiotensin becomes redundant and the coronavirus infection aggravates severely concurrent conditions and, therefore, can induce critical conditions and even death.

ACE2 is a major player in many pathological and physiological conditions. It is found that mice infected with SARS-CoV experience a shortage of ACE2; they have an elevated level of AngII and they develop severe conditions of the respiratory system [16]. The absence of ACE2, which maintains the protective function, results in RAS dysfunction and acute pathological respiratory conditions. Interestingly, the protective function of ACE2 in severe lung involvement can be observed not only during coronavirus infection. Restoration of the lung tissue was observed in laboratory mice, which had massive pulmonary edema, the severest form of hypoxia, hyaline degeneration and inflammable cellular infiltrates, when recombinant ACE2 was injected. ACE2 also protects against excessive inflammation when infected with the avian flu. The severity of the disease, its progression and lethality depend directly on the AngII level in blood plasma.

The presence of ACE2 in non-respiratory organs has a positive impact on functioning of the related tissues. Laboratory mice with endogenous deficiency of ACE2 develop severe cardiac involvement — decreased contractility caused by insufficient ventricular dilation and thinning of the left ventricular wall [9].

The concentration levels of ACE2 can increase after an ischemic stroke. It is a compensatory response aimed at removing excessive amounts of Ang (1–7) and at providing protective effects by balancing AngII.

ACE2 participates in pathological processes in renal tissue, though the exact mechanism is not obvious. Mice with ACE2 deficiency develop glomerulosclerosis and albuminuria [17]. Decreased concentration levels of ACE2 cause imbalance of AngII, which participates in inflammation of kidneys and fibrosis, thus explaining, though partially, the reasons for progressing renal disease.

An important non-peptidase function of ACE2 is its participation in transportation of amino acids through the wall of the small intestine. One of such amino acids is tryptophan regulating secretion of antimicrobial peptides, which have an impact on the intestinal microbiome composition. The latter can offer explanation to development of colitis in mice with ACE2 deficiency; the mice have disruption in the tryptophan transport; the disruption causes its deficiency, which leads to dysbiosis and inflammation.

Despite intensive therapy, the death rates from COVID-19 remain high. Creation of a vaccine is a time and labor-consuming process. Besides, SARS-CoV-2 tends to mutate in every replication cycle. It substantially complicates the development of a vaccine and even may make it useless. Theoretically, medications regulating the RAS imbalance can be used for other purposes. For example, they can be used to block the SARS-CoV-2 and ACE2 binding site; ACE2 can be used in a soluble form to inhibit the viral entry into the cell by binding to the RBD of the virus. Furthermore, ACE2 can subdue development of pathological changes by participating in different protective metabolic pathways.

The type II transmembrane serine protease, TMPRSS2, plays a key role in the cellular entry of SARS-CoV-2 and dysfunction of ACE2; therefore, if this enzyme is blocked, it may help prevent severe critical complications of COVID-19. It is found that the inhibitor camostat mesylate TMPRSS2 can partially block the TMPRSS2-ACE2-mediated entry of SARS-CoV-2 into the cell [18]. At the same time, the nafamostat mesylate, which inhibits the membrane fusion of the host cell and SARS-CoV-2, demonstrates ten times higher efficiency than camostat mesylate. Both camostat mesylate and nafamostat mesylate are clinically safe and, therefore, can be used for COVID-19 treatment in clinical practices. Nafamostat mesylate has another property — it can block the proteolysis of fibrinogen into fibrin. Coronavirus infection can cause increased D-dimer levels in blood serum. D-dimer is a fibrin degradation product and its concentration exceeding 1 mg/ml is associated with high risk of death for COVID-19 patients. Thus, nafamostat mesylate is potentially a product of dual action: It not only blocks the entry of SARS-CoV-2 into the cell, but also prevents thrombosis and disseminated intravascular coagulation. Clinical trials of this product intended for coronavirus infection treatment started in Japan in March 2020.

ACE inhibitors, AngII receptor blockers, agonists of AngII or Mas receptors may help fix impairments in RAS. AngII receptor blockers gain trust due to their proven symptomatic relief in case of pulmonary tissue injury caused by SARS and the avian influenza virus. It is expected that blocking of AngI receptors with the help of AngII receptor blocker will be more reliable than using ACE inhibitors, as AngII can be synthesized by different enzymes. It should be noted that the above products are clinically safe and commonly used. Paradoxically, based on clinical data [19], the increased ACE expression during treatment with the above medications does not cause any increase in the SARS-CoV-2 virulence. Studies of the human immunodeficiency virus (HIV) showed that the increased expression of HIV-binding CCR5 and CD4 sites protects patients against the virus virulence. HIV avoids superinfection during its entry into the cell by reducing the amounts

of CCR5. Such reduction facilitates efficient replication of the virus and, consequently, affects the pathological mechanisms of the acquired immune deficiency syndrome. It remains unclear whether this concept can be applied to SARS-CoV-2; however, if the coronavirus uses the similar mechanism, application of AngII receptor blockers and ACEI is well-reasoned.

Conclusion

Significant mutation changes in the SARS-CoV virus genome resulted in emergence of a stronger type, SARS-CoV-2, and caused a global pandemic in 2020. On the one hand, ACE2 plays a key role in the viral entry into the host cell; on the other hand, it protects the human body from severe damage that may be caused to internal organs by coronavirus infection. The development of a vaccine against the virus that undergoes numerous mutations is a labor-intensive and time-consuming process. Being aware of the ACE2 role in RAS, it is possible to use medications that can affect this metabolic pathway during treatment of COVID-19.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Wu F., Zhao S., Yu B., Chen Y.M., Wang W., Song Z.G., et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020; 579(7798): 265-9. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>
2. Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., Hu B., Zhang L., Zhang W., et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020; 579(7798): 270-3. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
3. Morse J.S., Lalonde T., Xu S., Liu W.R. Learning from the past: possible urgent prevention and treatment options for severe acute respiratory infections caused by 2019-nCoV. *ChemBiochem*. 2020; 21(5): 730-8. DOI: <http://doi.org/10.1002/cbic.202000047>
4. Song W., Gui M., Wang X., Xiang Y. Cryo-EM structure of the SARS coronavirus spike glycoprotein in complex with its host cell receptor ACE2. *PLoS Pathog*. 2018; 14(8): e1007236. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007236>
5. He J., Tao H., Yan Y., Huang S.Y., Xiao Y. Molecular Mechanism of Evolution and Human Infection with SARS-CoV-2. *Viruses*. 2020; 12(4): 428. DOI: <http://doi.org/10.3390/v12040428>
6. Banerjee A., Kulcsar K., Misra V., Frieman M., Mossman K. Bats and coronaviruses. *Viruses*. 2019; 11(1): 41. DOI: <http://doi.org/10.3390/v11010041>
7. Tipnis S.R., Hooper N.M., Hyde R., Karran E., Christie G., Turner A.J. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J. Biol. Chem*. 2000; 275(43): 33238-43. DOI: <http://doi.org/10.1074/jbc.M002615200>
8. Lambert D.W., Yarski M., Warner F.J., Thornhill P., Parkin E.T., Smith A.I., et al. Tumor necrosis factor- α convertase (ADAM17) mediates regulated ectodomain shedding of the severe acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) receptor, angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2). *J. Biol. Chem*. 2005; 280(34): 30113-9. DOI: <http://doi.org/10.1074/jbc.M505111200>
9. Hamming I., Cooper M.E., Haagmans B.L., Hooper N.M., Korstanje R., Osterhaus A.D., et al. The emerging role of ACE2 in physiology and disease. *J. Pathol*. 2007; 212(1): 1-11. DOI: <http://doi.org/10.1002/path.2162>

10. Li M.Y., Li L., Zhang Y., Wang X.S. Expression of the SARS-CoV-2 cell receptor gene ACE2 in a wide variety of human tissues. *Infect. Dis. Poverty*. 2020; 9(1): 45. DOI: <http://doi.org/10.1186/s40249-020-00662-x>
11. Li W., Moore M.J., Vasilieva N., Sui J., Wong S.K., Berne M.A., et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*. 2003; 426(6965): 450-4. DOI: <http://doi.org/10.1007/s00018-004-4242-5>
12. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y., et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020; 395(10223): 497-506. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
13. Chen N., Zhou M., Dong X., Qu J., Gong F., Han Y., et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*. 2020; 395(10223): 507-13. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7)
14. Holshue M.L., DeBolt C., Lindquist S., Lofy K.H., Wiesman J., Bruce H., et al. First case of 2019 novel coronavirus in the United States. *N. Engl. J. Med*. 2020; 382(10): 929-36. DOI: <http://doi.org/10.1056/NEJMoa2001191>
15. Yan T., Xiao R., Lin G. Angiotensin-converting enzyme 2 in severe acute respiratory syndrome coronavirus and SARS-CoV-2: A double-edged sword? *FASEB J*. 2020; 34(5): 6017-26. DOI: <http://doi.org/10.1096/fj.202000782>
16. Kuba K., Imai Y., Rao S., Gao H., Guo F., Guan B., et al. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat. Med*. 2005; 11(8): 875-9. DOI: <http://doi.org/10.1038/nm1267>
17. Ye M., Wysocki J., William J., Soler M.J., Cokic I., Battie D. Glomerular localization and expression of Angiotensin-converting enzyme 2 and Angiotensin-converting enzyme: implications for albuminuria in diabetes. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2006; 17(11): 3067-75. DOI: <http://doi.org/10.1681/ASN.2006050423>
18. Xiao L., Sakagami H., Miwa N. ACE2: The key molecule for understanding the pathophysiology of severe and critical conditions of COVID-19: demon or angel? *Viruses*. 2020; 12(5): 491. DOI: <http://doi.org/10.3390/v12050491>
19. Rico-Mesa J.S., White A., Anderson A.S. Outcomes in patients with COVID-19 infection taking ACEI/ARB. *Curr. Cardiol. Rep*. 2020; 22(5): 31. DOI: <http://doi.org/10.1007/s11886-020-01291-4>

Information about the authors:

Polina O. Shatunova — student, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 119991, Moscow, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7478-8783>.

E-mail: ppolite@mail.ru

Anatoly S. Bykov — D. Sci. (Med.), Prof., Department of Microbiology, Virology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 119991, Moscow, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8099-6201>.

Oksana A. Svitich — D. Sci. (Med.), Corresponding Member of RAS, Prof., Department of Microbiology, Virology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 119991, Moscow, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>.

Vitaly V. Zverev — D. Sci. (Biol.), Full Member of RAS, Head, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 119991, Moscow, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5808-2246>.

Contribution: the authors contributed equally to this article.

Информация об авторах:

Шатунова Полина Олеговна — студент ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Москва, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7478-8783>.

E-mail: ppolite@mail.ru

Быков Анатолий Сергеевич — д.м.н., проф. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Москва, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8099-6201>.

Свитич Оксана Анатольевна — д.м.н., член-корреспондент РАН, проф. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Москва, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>.

Зверев Виталий Васильевич — д.б.н., академик РАН, зав. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Москва, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5808-2246>.

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



Современные представления о про-/эукариотических взаимодействиях организма человека — основа создания нового поколения пробиотических препаратов

Михайлова Н.А., Воеводин Д.А.[✉], Лазарев С.А.

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

Многочелюстные организмы в совокупности с сапрофитной флорой формируют сложные, глубоко интегрированные химерные системы (ассоциативные симбиозы, метаорганизмы) с выраженным взаимным влиянием про- и эукариотического компонентов. Способность микроорганизмов (МО) к симбиотическому взаимодействию формируется только в условиях целостного организма.

При длительном выращивании на искусственных средах симбиотические МО, адаптируясь к существованию в искусственных условиях, постепенно и обратимо утрачивают способность к ассоциативному взаимодействию с организмом человека, что приводит к снижению терапевтической эффективности пробиотических препаратов, приготовленных на их основе. Для повышения терапевтической активности пробиотических МО необходима их функциональная реабилитация.

При развитии патологического процесса складываются предпосылки формирования вторичного обменного дисбиоза, вследствие этого изменения регуляторных процессов самого индивида становятся препятствием для восстановления нормальной микрофлоры. Поэтому функциональная реабилитация пробиотических МО должна проводиться на этапе культивирования, а процесс культивирования должен в необходимой степени воспроизводить условия целостного организма.

Ключевые слова: пробиотики; регуляторные пептиды; белковый гидролизат; дисбиоз; коррекция.

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: Михайлова Н.А., Воеводин Д.А., Лазарев С.А. Современные представления о про-/эукариотических взаимодействиях организма человека — основа создания нового поколения пробиотических препаратов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2020; 97(4): 346–355. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-7>

Поступила 12.02.2020

Принята в печать 11.05.2020

A modern view of pro-/eukaryote interactions in the human body as the basis for development of next-generation probiotics

Natalia A. Mikhailova, Dmitry A. Voevodin[✉], Sergey A. Lazarev

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

Multicellular organisms and the saprophytic flora form complex, highly integrated chimeric systems (associative symbioses, metaorganisms) characterized by interplay between pro- and eukaryotic components. To be able to interact symbiotically microorganisms (MO) need a whole body.

When grown on artificial media for a long time, symbiotic MO have to adapt to the artificial environment and gradually, though reversibly, lose their ability of associative interaction with the human body, thus causing a decrease in the therapeutic efficacy of MO-derived probiotic products. To increase the therapeutic activity of probiotic MO, they must be functionally rehabilitated.

A pathological process induces development of a secondary metabolic dysbiosis; as a result, changes in the regulatory processes of an individual interfere with the restoration of the normal microflora. Therefore, functional rehabilitation of probiotic MO must take place during cultivation, while the cultivation process must replicate the whole-body conditions.

Keywords: probiotics; regulatory peptides; protein hydrolysate; dysbiosis; correction.

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: Mikhailova N.A., Voevodin D.A., Lazarev S.A. [A modern view of pro-/eukaryote interactions in the human body as the basis for development of next-generation probiotics]. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, épidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(4): 346–355. (In Russ.).
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-7>

Received 12 February 2020
Accepted 11 May 2020

Введение

Человек является многоклеточным эукариотом, который сформировался в мире бактерий, существовавших задолго до его появления. Филогенетически эволюционирующая иммунная система сталкивалась с бактериальными сигналами сотни миллионов лет, приспосабливалась реагировать на них, поэтому формирование и коррекция структуры симбиотической микробиоты в настоящее время активно изучается.

Несмотря на обилие и многообразие информации по формированию и коррекции структуры симбиотической микробиоты, работы, проводимые в этой области, носят разрозненный характер. С одной стороны, это свидетельствует о том, что для большинства авторов восприятие проблемы не вышло за рамки первоначального накопления информации с оценкой данных с позиций традиционно упрощенных («инфекционных», антагонистических) представлений. С другой — разнообразие обсуждаемых «дисбиозассоциированных» патологических состояний поднимает вопрос об общепатологическом значении симбиотической микробиоты в формировании заболеваемости у человека и роли коррекции дисбиоза в комплексной терапии.

Однако признание важной роли дисбиоза в развитии патологических состояний у человека само по себе еще не решает никаких проблем. По нашему мнению, первопричиной сложившейся противоречивой ситуации являются упрощенные (искаженные) представления о взаимодействии собственно организма хозяина и его микробиоты с разделением единой про-/эукариотической системы целостного организма на два персонафицированных, часто антагонистичных субъекта.

Формирование адекватных представлений о про-/эукариотических взаимодействиях является важной практической задачей настоящего момента, позволит выявить роль микробиоты среди причин и механизмов развития патологического состояния, наметить комплекс возможных терапевтических подходов с определением необходимых характеристик лекарственных средств, способов их производства и применения.

Влияние регуляторных процессов хозяина на структурно-функциональное состояние симбиотической микрофлоры

Первый шаг к обобщающему взгляду на проблему про-/эукариотических взаимодействий ор-

ганизма человека сделан акад. О.В. Бухариным с соавт. [1], предложившими концепцию «ассоциативного симбиоза» (АС). «АС представляет собой многокомпонентную интегральную систему, включающую хозяина в качестве макропартнера, стабильный доминантный микросимбионт и ассоциированные микросимбионты с разнонаправленными воздействиями, определяющими формирование, стабильность существования и продуктивность симбиоза в целом» [1]. Концепция АС постулирует тесную взаимосвязь между микро- и макросимбионтами без достаточной детализации, что затрудняет ее полноценное практическое использование.

Расширяя и конкретизируя положения АС, но уже с учетом динамических превращений, которым подвержены как прокариотические, так и эукариотические элементы системы, было предложено положение о про-/эукариотическом химеризме организма человека. «Взаимное функциональное проникновение систем цитокинов и QS-медиаторов позволяет рассматривать микробиоценоз как экстракорпоральную, цитокиноподобную, негенетически наследуемую регуляторную систему организма носителя, а целостный организм человека как про-/эукариотическую химеру, приближая, по сути, методы бактериотерапии к методам цитокиновой и клеточной терапии» [2].

Данное положение сформулировано на основе опыта клинического использования препаратов пробиотиков и цитокинов, подтвердившего схожий, взаимопотенцирующий результат при терапевтическом применении этих препаратов [3]. В последующем приведенное положение получило прямое подтверждение. В серии работ [4–7] была продемонстрирована способность микроорганизмов (МО) продуцировать широкий спектр цитокиноподобных медиаторов в количествах, сопоставимых с продукцией цитокинов клетками крови человека. Добавление в культуральную среду бактерий синтетического аналога гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора стимулировало продукцию цитокиноподобных агентов МО [7]. Авторы используют термин «цитокиноподобные агенты», поскольку их структурная идентичность цитокинам не установлена, однако определение возможно с помощью стандартных тест-систем, предназначенных для определения цитокинов.

Выявленные обстоятельства не только расширяют наши представления о про-/эукариотических

взаимоотношениях в целостном организме и объясняют многообразие терапевтических эффектов пробиотиков, но и имеют, как нам кажется, большое практическое значение при разработке пробиотических препаратов, обуславливая возможность и необходимость модулирования функциональной активности пробиотических свойств.

С обобщенных позиций целостный организм человека можно рассматривать как функциональную химеру (по принятой в западной литературе терминологии — «метаорганизм»), состоящую из двух по сути равноценных подсистем, организованных по схожему принципу (ауто-/паракринная сетевая регуляция на уровне межклеточных и межбактериальных взаимодействий) и обладающих схожим «языком» коммуникаций, с неизбежным и закономерным за счет структурно-функционального (филогенетического) родства перекрестным взаимодействием. Изменения в одной из подсистем неизбежно порождают изменения в другой, что дает право говорить о наличии в организме человека единой двунаправленной регуляторной системы микробиоценоз–цитокины–гормоны (МЦГ).

Например, дисбаланс микробиоты рассматривается как причина или предрасполагающий фактор сахарного диабета 1-го типа (СД1) и метаболического синдрома (ожирение, атеросклероз, гипертония, сахарный диабет 2-го типа) [8], а недостаточно контролируемая гормонотерапия — как патогенетический фактор вторичного гормонообусловленного дисбиоза [9].

Участие регуляторной системы МЦГ широко проявляется в клинической практике, в переломные моменты онтогенеза, при гормональной перестройке, связанной с беременностью: стресс с развитием постстрессорного дисбиоза и постстрессорного синдрома, дисбиоз беременных с развитием осложненной беременности, дисбиоз пожилого возраста с развитием возрастной патологии, негативные или позитивные изменения при половом созревании в подростковом возрасте. Процесс запускается естественными изменениями гормонального фона макропартнера, но клинические изменения обусловлены перестройками в системе микросимбионтов. «Изменения состава нормальной микрофлоры, нарушения системы иммунитета и симптомы заболевания должны рассматриваться в их сочетании..., так как ведущую роль играет состояние иммунологической реактивности макроорганизма, а не вирулентность возбудителя» [10].

Однако подобная реакция развивается не у всех, а негативный или позитивный сценарий предопределяется задолго до клинической манифестации и связан с формированием микробиоценоза в перинатальном возрасте (перинатальное программирование), происходящим под влиянием материнской микрофлоры [11]. По нашему мнению, акти-

вация роста условно-патогенной флоры, сопряженная с манифестацией заболевания и определяющая его развитие, является результатом нейро-цитокино-гормональных изменений, происходящих в условиях стресса (в том числе инфекционного) или естественного изменения гормонального статуса (беременность, старение, половое созревание), с активацией условно патогенной флоры как депрессивного (до поры скрытого) компонента микробиоценоза, сформировавшегося, однако, в перинатальном возрасте. Отсюда негенетическая наследуемость (т.е. контактная передача от матери) предрасположенности к патологическому процессу, «программируемые» в младенчестве предпосылки патологии зрелого возраста.

Тесная зависимость микробиоты от обменных процессов носителя позволяет использовать неожиданные, на первый взгляд, подходы в терапии и профилактике инфекционно-воспалительных заболеваний. Например, применение тестостерона в терапии простатита позволяет восстановить микрофлору мочеполовой сферы и купировать воспалительные проявления без использования антибиотиков [12], или применение синтетического аналога природного иммуномодулятора и адаптогена тафцина («Селланк») для профилактики постстрессорных, в том числе дисбиотических [13], нарушений.

Модели обменных (гормонообусловленных) дисбиозов особенно подчеркивают значимую роль регуляторных процессов хозяина в формировании и поддержании дисбиотических сдвигов, именно регуляторные процессы хозяина запускают и поддерживают их с формированием порочного круга: обменно-регуляторные сдвиги — дисбиоз — усугубление обменно-регуляторных нарушений с развитием дисбиозассоциированных патологических состояний.

Таким образом, сам организм хозяина (его регуляторные процессы), формируя порочный круг, становится активным препятствием для восстановления нормальной микрофлоры. Применение на этом фоне пробиотических препаратов с низкой метаболической активностью (лиофилизированные бактериальные препараты) заведомо малоэффективно. Это наводит на мысль, что для успешного использования пробиотических средств, вырабатываемых на основе музейных (фармакологических) штаммов, необходима предшествующая функциональная реабилитация, повышающая их метаболическую активность и адаптацию к условиям существования в целостном организме (см. ниже).

«Изменения в составе микрофлоры слизистых происходят значительно раньше, чем проявляются клинические симптомы, поэтому их можно считать предвестниками обусловленных условно-патогенной микрофлорой патологических процессов» [10]. В чем причина паузы между формированием ки-

печного дисбиоза и манифестацией его клинических проявлений?

Наиболее ярко процессы про-/эукариотического химеризма проявляются на модели эндогенного микробиоценоза, в которой в наибольшей мере выражена степень сродства про- и эукариотического элементов единой системы целостного организма, взаимные влияния симбиотической микрофлоры и организма хозяина.

Обсуждение проблемы дисбиоза у человека, как правило, сводится к оценке качественного и количественного состава микрофлоры в естественных полостях организма. Многие авторы продолжают придерживаться положения о стерильности внутренней среды организма человека. В то же время у растений общепринято деление сапрофитной микрофлоры на экзо- и эндофитную (экзо- и эндогенную). А у человека это не так? Тогда откуда признанные проблемы образования биопленок на эндопротезах, выявления МО в атерогенных бляшках, внутриклеточной персистенции инфекционных агентов и пр.? При этом перечень МО, способных к внутриклеточной персистенции, расширяется с каждым годом. Роль эндогенной флоры обсуждается при наличии явного инфекционного и инфекционно-воспалительного процессов. А если формируется иммунологическая толерантность или иммунологическая гипореактивность, а воспалительная реакция в силу этого слабо выражена или отсутствует — значит, эндогенной флоры нет? Маловероятно.

Основной успех в изучении эндогенной микрофлоры и связанных с этим явлений достигнут в растениеводстве. Способность растений к вегетативному размножению порождает соблазн многократного тиражирования экономически наиболее продуктивных особей, при этом размножение возможно не только отдельными органами, но и небольшими фрагментами тканей (экспланты). Однако оказалось, что негативная роль эндогенной (эндофитной) микрофлоры может являться серьезным препятствием для широкого использования метода клонирования.

Относительно низкая требовательность растительных клеток к условиям культивирования, их высокий регенеративный потенциал, способность к многократному пассированию эксплантов позволили создать достаточно информативную модель для выявления и изучения эндогенной микробиоты, ее функциональных особенностей, роли в формировании фенотипа хозяина. Подобные модели на основе клеток животных и человека пока не созданы. Однако в литературе подчеркивается лишь относительная правомерность исторического деления на микрофлору человека, животных и растений [14, 15], поскольку показана способность одних и тех же патогенных бактерий персистировать как в орга-

низме человека, так и в растениях [14] и, напротив, способность одних и тех же пробиотических МО оказывать защитный эффект на организмы человека, животных и растений в отношении патогенных воздействий (многочисленные препараты на основе *Bacillus subtilis*). Столь же условно с позиций общей биологии деление моделей на растительные и животные, поэтому фитомодель эндогенного микробиоценоза привлекает внимание не только фитобиологов, но и представителей других биологических и медико-биологических специальностей.

Препятствием для выявления и изучения эндогенных МО методами классической микробиологии является их существование во внутренней среде хозяина в виде некультивируемых форм. Долгое время было принято считать, что образование некультивируемых форм бактерий связано с воздействием травмирующих факторов. Последние данные демонстрируют односторонность этого мнения. Становясь элементом единой про-/эукариотической системы, МО естественным образом подчиняются ее законам, по которым автономный, неконтролируемый рост недопустим. Обратимо утрачивая способность к пролиферации (автоному росту), эндогенные МО приобретают способность эффективно функционировать в рамках гетерогенной про-/эукариотической системы, влияя на обменные процессы хозяина, участвуя в формировании его фенотипических характеристик, в значительной мере определяя устойчивость макроорганизма к инфекционным воздействиям [16]. В последнем случае защитный эффект реализуется не только через реакции прямого антагонизма, но и через активацию защитных механизмов самого хозяина [17]. В этом контексте пробиотическую функцию МО следует рассматривать как функциональное, неконститутивное состояние, формирующееся только в условиях целостного организма и под воздействием регуляторных сигналов хозяина. Вне регуляторных воздействий хозяина (музейное содержание вне системы) пробиотическая функция за ненадобностью, видимо, снижается. Эти обстоятельства необходимо учитывать при разработке пробиотических средств.

Предположим, что внутрисредовая и внутриклеточная персистенция МО, являясь общебиологическим состоянием для многоклеточных эукариот, — это нормальная, естественная составляющая про-/эукариотических систем (метаорганизмов). Она имеет большое практическое значение в медицине не только для формирования фенотипических характеристик хозяина (физическое благополучие/неблагополучие), но и для определения сроков корригирующих мероприятий и, пусть это покажется неожиданным, для формирования методологических, в перспективе и методических, основ разработки пробиотических средств. Эндогенный ми-

кробиоценоз в контексте настоящей статьи — это модель для выявления механизмов регуляции функциональной активности МО, изучаемая с целью использования выявленных механизмов для модуляции функциональной активности пробиотических бактерий и создания природоподобных технологий разработки пробиотических лечебных средств.

Возникает вопрос: имеет ли значение, какие МО представлены в эндогенном пуле? Понятно, что конечные эффекты эндогенной микрофлоры обусловлены видовой принадлежностью МО — например, зависимость повышения или снижения жизнеспособности растительных эксплантов в культуре от видового состава эндогенной микрофлоры [15].

В случае изменения регуляторных процессов хозяина, при доминировании условно-патогенной флоры в микробиоценозе и у человека [10], и у растений [15] происходит функциональная активация патогенного начала условно-патогенных МО, восстанавливается способность бактерий к культивированию (автономному существованию) [18].

Естественным источником эндогенного пула у человека служат, прежде всего, МО естественных полостей. Например, считается, что причиной эндогенных бактериальных инфекций является гематогенный занос микрофлоры слизистых в органы внутренней среды [19].

Эти рассуждения указывают на необходимость, во-первых, деления дисбиоза на экзо- и эндогенную составляющие и, во-вторых, проведения корректирующей дисбиоз терапии с учетом не только микрофлоры полостей, но и эндогенной компоненты. Необходимо учитывать, что кишечная (экзогенная) микрофлора более доступна для корректирующих мероприятий по сравнению с эндогенной, отсюда отсроченность эффектов дисбиозкорректирующей терапии [9] — обратная параллель с формированием кишечного дисбиоза и отмеченной выше отсроченностью его клинических проявлений.

Учет эндогенной компоненты проявляется, прежде всего, в определении сроков проводимых мероприятий, позволяющих добиться «физиологической» санации, т.е. естественной смены клеточной популяции — резервуара внутриклеточных микробиологических агентов. Более эффективных методов внутриклеточной санации на настоящий момент не разработано.

В различных областях медицины можно столкнуться с любопытными параллелями: пробиотикотерапия, проводимая свыше 6 мес, приводит к обратному развитию поздних осложнений у детей с СД1 [9]; через 6 мес после трансплантации почки резко снижается вероятность отторжения органа [20]; критическим возрастом у детей с тяжелыми врожденными уродствами считается возраст 6 мес, если ребенок преодолевает этот порог — положительный прогноз выживания повышается [21]. В

приведенных случаях эффект обусловлен сменой клеточной популяции с «физиологической» санацией, как при СД1, или с формированием трансплантационного химеризма, т.е. с постепенной заменой в трансплантате клеток донора на клетки реципиента со снижением иммуногенности и вероятности отторжения трансплантата. Сама повторяемость срока указывает на его функциональное значение, зависимость клинической эффективности пробиотикотерапии от физиологических процессов носителя. По нашему мнению, при проведении пробиотикотерапии срок 6 мес следует рассматривать как минимально необходимый, но в каждом случае этот вопрос должен решаться, исходя из индивидуальных и нозологических особенностей пациента и особенностей используемых пробиотических средств.

В необходимости длительной пробиотикотерапии, разновидности антибактериальной терапии, нет ничего необычного или неожиданного. Длительные курсы антибиотиков с достаточной эффективностью показали себя при тяжелых инфекционных и инфекционно-воспалительных заболеваниях: туберкулезе, лепре, ревматизме и др. В основе длительной антибиотикотерапии лежат те же принципы, что и при длительной пробиотикотерапии, но пробиотики имеют ряд преимуществ: возможность длительного неосложненного применения, занятие экологических ниш с профилактикой эндогенного реинфицирования, системный общетерапевтический эффект.

Отсутствие (несформированность) целостной идеологии и методологии проблемы нормоценоза/дисбиоза и про-/эукариотических взаимодействий является первопричиной, формирующей комплекс проблем, затрудняя не только разработку эффективных лечебных средств, но и клиническое использование этого направления в целом. В конце концов, пробиотики — это инструмент, который необходимо не только уметь «настраивать», но которым надо уметь пользоваться.

Под дисбиозом понимают нарушения микробиологического пейзажа естественных полостей организма человека и кожи, т.е. в основу положен микробиологический подход, не учитывающий роли носителя. При клиническом рассмотрении этого вопроса и в соответствии с доминирующим принципом организации здравоохранения (нозологический принцип) общемедицинская проблема (микробиоценоз/дисбиоз) оказалась разделена на «сферы влияния» между гастроэнтерологами, стоматологами, дерматологами и пр. Узкие специалисты пытаются решать общепатологическую и даже общебиологическую проблему (общую для всех многоклеточных эукариот) с позиций своего узкоспециального подхода, ограничивая представления о клинических проявлениях дисбиоза только областью своих про-

фессиональных интересов. Для таких специалистов, как гематологи, эндокринологи и пр., которым «не досталось естественных полостей», если только они не проявляют личной инициативы, клиническая проблема дисбиоза отсутствует.

На настоящем этапе произошло невольное разделение понятия «дисбиоз» на микробиологическое состояние и клиническое. Диагностикой и выработкой рекомендаций по коррекции дисбиоза как микробиологического состояния занимаются микробиологи, а как клинического — врачи узких специальностей. При этом первые не видят результатов воздействия микробиоценоза на носителя, не знают специфики конкретного заболевания, не учитывают роли носителя в формировании дисбиоза, а вторые, в силу узконаправленной подготовки, не способны в полной мере оценить системность причинно-следственных процессов, приведших к развитию конкретного клинического состояния. В результате и у тех, и у других возникает недопонимание важности проблематики. Для успешного решения проблемы дисбиоза нужны специалисты, способные преодолеть этот разрыв.

Состояние АС, в клиническом контексте этого явления, — является переменным и складывается не только из текущих микробиологических характеристик, из позитивных и негативных влияний микробиоценоза на носителя, но и из текущей способности носителя реагировать на негативные и позитивные влияния микросимбионтов. Без восстановления обменных процессов, их энергообеспеченности рассчитывать на эффективность реабилитационных мероприятий нельзя. Использование средств нормализации обменно-регуляторных процессов носителя — составной элемент купирования дисбиоза как клинического состояния. Поэтому в клинической практике для достижения лучшего результата необходимо рассматривать организм человека как целостную про-/эукариотическую систему и корригировать не только микробиоценоз, но всю систему АС в целом. В реальной практике, при использовании комплексного подхода, так и происходит, но опора на адекватную методологию позволяет более осознанно и эффективно применять комплексный инструментарий, существенно расширить его перечень.

Клиническое (не путать с микробиологическим) состояние дисбиоза в самом общем виде, с позиций общей патологии — это, прежде всего, нарушение обменно-регуляторных процессов носителя (дисфункция цитокиноподобной регуляторной системы), инициация состояния тканевой гипоксии. Нозологические формы процесс приобретает под действием дополнительных условий: исходный микробиологический спектр в сочетании с внешним микробиологическим воздействием («микросимбиоценоз» по О.В. Бухарину [22]), индивидуальная

иммунореактивность (толерантность), генетические особенности, бытовые привычки и пр. Конкретные клинические проявления — это, по сути, отражение сиюминутного состояния АС (состояния про-/эукариотического химеризма) конкретного индивида, т.е. клинические проявления дисбиоза обусловлены множеством переменных, микробиологическая переменная — лишь одна из них. Отсюда сложность диагностики (прогнозирования) клинических проявлений только по микробиологическим показателям, невозможность моделирования процесса, т.е. невозможность использования современного понятийного микробиологического инструментария для моделирования и коррекции процессов, формирующих АС.

Положение о регуляторной системе МЦГ позволяет рассматривать текущее состояние индивида как интегральное отражение функционального состояния системы АС, использовать двунаправленный, взаимопотенцирующий подход (т.е. одновременное воздействие как на прокариотический, так и на эукариотический элементы) в коррекции состояния системы.

Приведенные рассуждения приобретают смысл только при наличии в арсенале врача эффективных средств коррекции микробиоценоза.

Постулированная равноценность подсистем в АС повышает биологическое значение микрофлоры в обеспечении процессов жизнедеятельности носителя, позволяет предположить ведущую роль дисбиоза в развитии как приобретенной, так и врожденной патологии человека, обоснованно расширяет спектр терапевтических подходов, закономерно актуализирует проблему разработки эффективных пробиотических средств и формирует методологическую основу для разрешения этой проблемы.

Использование природоподобных технологий для создания лечебных пробиотических средств

Модель эндогенного микробиоценоза указывает на возможность существования симбионтных микроорганизмов в двух формах: в форме свободноживущих (независимых от хозяина) бактерий и бактериальных ассоциаций и в форме тесной ассоциации с организмом хозяина. Оба способа существования формируются под влиянием текущих внешних условий, могут переходить друг в друга, сопровождаются функциональными, физиологическими, генетическими, иногда морфологическими изменениями МО [23]. МО, обитающие в кишечнике человека, играя роль камбиальной популяции для восполнения эндогенной микробиоты, находятся, вероятно, в промежуточном состоянии, т.е. не утратили в полной мере связи с регуляторными процессами хозяина, но обладают способностью к свободному росту.

Изначально многие пробиотические МО были выделены из кишечника человека, однако длительное культивирование МО в лабораторных условиях приводит к переходу бактерий в состояние, характерное для свободноживущих форм, с возможным снижением пробиотической активности. При разработке пробиотических препаратов необходимо учитывать, что свободноживущие формы не имеют возможности для функциональной реверсии в организме больного из-за блокирующих регуляторных воздействий самого человека, отсюда недостаточная клиническая эффективность существующих пробиотиков. Поэтому функциональную реабилитацию (реверсию) необходимо проводить на этапе культивирования производственных штаммов.

На ту же зависимость функциональных проявлений симбиотических МО от условий обитания, но на примере условно-патогенной микрофлоры, указывают и другие авторы: «Экспрессия генов, определяющих вирулентность, не является конститутивной. ... Гены вирулентности «выключаются» при переходе микроорганизма во внешнюю среду и «включаются» в организме хозяина» [10].

Формирование единой про-/эукариотической системы возможно только при условии единого языка коммуникаций, т.е. наличии языка взаимодействия, понятного обеим сторонам. В качестве такого языка может выступать система регуляторных пептидов. Способность влиять на ростовые и функциональные свойства МО показана для фактора некроза опухоли, интерлейкинов-2, -6, эмбриональной сыворотки, антибактериальных пептидов [24, 25]. В последнем случае подчеркивается, что антибактериальный эффект проявляется только при повышенных концентрациях агента, а при физиологических концентрациях эффект «антибактериальных» пептидов ограничивается регуляторными воздействиями [26].

Пептидная регуляция является по меньшей мере одним из механизмов, посредством которых организм хозяина воздействует на функцию микробиоты. Познание и использование данного механизма, варьируя комплекс регуляторных пептидов, позволит, по нашему мнению, получать пробиотические препараты с заданной функциональной активностью. В этом положении заключены возможные методические нюансы, которые необходимо учитывать при разработке и производстве пробиотических препаратов.

Филогенетическое родство в организации про- и эукариотических систем проявляется на различных моделях. Предполагают, что прокариоты для амплификации генома, дифференцировки и роста клеток используют ту же стратегию, что и эукариоты [23]. Показана способность МО продуцировать регуляторные агенты, схожие с таковыми у эукариот [2, 27]. Средство процессов, протекающих в

про- и эукариотических элементах системы, заставляет предположить, по аналогии с эукариотами, зависимость функциональной активности бактерий от возраста культуры: суммарный пробиотический (терапевтический) эффект культуры МО (пробиотического препарата), спектр продуцируемых МО агентов и, соответственно, характер терапевтического воздействия будут зависеть от функциональной «зрелости» культуры МО. У эукариот подобная зависимость регуляторного спектра от «зрелости» процесса показана неоднократно и на различных моделях [28], вероятно, являясь общей закономерностью для доклеточных и клеточных сообществ.

В естественных условиях регуляторные агенты пептидной природы образуются при гидролизе крупных молекул-предшественников, т.е. являются естественными (природными) гидролизатами. Эта закономерность позволяет надеяться, что использование контролируемого гидролиза с подбором протеолитических агентов, исходного субстрата, необходимых условий реакции, с контролем и стандартизацией регуляторной активности образующихся агентов позволит получить материал с необходимыми характеристиками для применения в качестве основы культуральных сред при выращивании пробиотических культур.

Возможно возражение: белковые гидролизаты давно и активно используются в микробиологии. Да, это так. Однако, замыкаясь в рамках традиционных представлений, микробиологи не учитывали возможную регуляторную роль пептидных молекул гидролизата, рассматривая его только как источник азотистого питания, с оценкой результатов с позиций нутрициологии. Кроме того, при подготовке культуральных сред традиционно широко используется высокотемпературная стерилизация, приводящая к возможной инаktivации регуляторных пептидов. Этот факт требует дальнейшего осмысления и изучения, как и ситуация, предполагающая учет способности МО реализовывать свои функции не в прямых, а в опосредованных через организм хозяина процессах.

Заключение

Положение об АС (метаорганизме) изменяет методологию разработки пробиотических препаратов: для инициации пробиотической функции условия культивирования пробиотических МО должны воспроизводить условия целостной про-/эукариотической системы, а оценку терапевтической эффективности необходимо проводить не только по антагонистической активности *in vitro* и способности влиять на микробиологический пейзаж *in vivo*, но и по суммарной клинической эффективности в соответствии с критериями тяжести основного заболевания. Клинико-экспериментальные модели очень трудоемки и продолжительны, а потому плохо

подходят для оперативного решения задач. В этой связи чрезвычайно важной задачей становится выявление критерия, определяемого *in vitro*, но позволяющего прогнозировать терапевтическую эффективность пробиотического препарата в условиях целостного организма. Таким критерием может послужить способность МО синтезировать системобразующие медиаторы (цитокины и лектины), чья важная роль отмечена для функционирования как прокариотических, так и эукариотических систем [5, 27]. Кроме того, нельзя не учитывать зависимость уровня продукции этих медиаторов от условий обитания с заметным снижением у музейных штаммов [5, 29].

Обобщение представленных данных позволяет заключить, что пробиотическая функция МО не является конститутивной, формируется только в условиях целостного организма и находится под контролем регуляторных процессов хозяина. Это ключевое обстоятельство необходимо учитывать при разработке пробиотических средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бухарин О.В., ред. *Ассоциативный симбиоз*. Екатеринбург; 2007.
2. Розанова Г.Н., Воеводин Д.А. Случай эффективного использования пробиотиков в комплексной терапии тяжелой формы сахарного диабета 1-го типа при кишечном дисбактериозе. *Клиническая медицина*. 2008; 86(1): 67-8.
3. Воеводин Д.А., Розанова Г.Н., Стенина М.А., Скрипник А.Ю., Чередеев А.Н. Роль иммунологических реакций в адаптивном процессе у детей с сахарным диабетом типа 1, филогенетическая концепция антистрессорной адаптации. *Иммунология*. 2003; 24(2): 103-7.
4. Фомина Л.О., Зурочка В.А., Симбирцев А.С., Гриценко В.А. Влияние времени культивирования *Staphylococcus aureus* на продукцию ими цитокино-подобных веществ, детектируемых методом иммуноферментного анализа. *Российский иммунологический журнал*. 2018; 12(3): 454-9. DOI: <http://doi.org/10.31857/S102872210002427-4>
5. Зурочка А.В., Дукардт В.В., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Зуева Е.Б., Тяпаева Я.В. и др. Стафилококки как продуценты цитокиноподобных веществ. *Российский иммунологический журнал*. 2017; 11(2): 134-6.
6. Зурочка А.В., Дукардт В.В., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Зуева Е.Б., Тяпаева Я.В. и др. Бактерии как продуценты цитокино-подобных веществ. *Российский иммунологический журнал*. 2017; 11(3): 374-6.
7. Зурочка А.В., Дукардт В.В., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Зуева Е.Б., Белозерцева Ю.П. и др. *Staphylococcus aureus*: спонтанная продукция цитокино-подобных веществ и ее регуляция синтетическим аналогом активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ). *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*. 2017; (1): 3.
8. Бондаренко В.М., Малеев В.В., Лиходед В.Г. Кишечная микрофлора, ожирение и диабет 2 типа. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2014; 91(3): 42-9.
9. Розанова Г.Н., Воеводин Д.А., Стенина М.А., Кушнарeva М.В. Патогенетическая роль дисбактериоза в развитии осложнений сахарного диабета 1 типа у детей. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2002; 133(2): 196-8. DOI: <http://doi.org/10.1023/A:1015503006854>
10. Караулов С.В., Афанасьев С.С., Алешкин В.А., Бондаренко Л.Н., Воропаева Е.А., Афанасьев М.С. и др. Механизмы приобретения вирулентности условно-патогенными микроорганизмами и формирования пула нозокомальных штаммов в микробиоценозах слизистых открытых полостей организма. *Астраханский медицинский журнал*. 2018; 13(2): 17-31. DOI: <http://doi.org/10.17021/2018.13.2.17.31>
11. Воеводин Д.А., Розанова Г.Н., Поддубиков А.В., Михайлова Н.А. Микробиоценоз, иммунная система и наследственность. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2017; 94(2): 116-26. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2017-2-116-126>
12. Тюзико И.А., Калинин С.Ю., Ворслов Л.О., Греков Е.А. Коррекция андрогенного дефицита при хроническом инфекционном простатите как патогенетический метод преодоления неэффективности стандартной антибактериальной терапии на фоне растущей антибиотикорезистентности. *Андрология и генитальная хирургия*. 2013; 14(1): 55-63.
13. Мухина А.Ю., Свищева М.В., Медведева О.А., Калущкий П.В., Шевченко А.В., Бобынцев И.И. и др. Применение пептида THR-LYS-PRO-ARG-PRO-GLY-PRO («Селанка») для коррекции дисбиоза при хроническом иммобилизационном стрессе. Патент РФ № 2681217; 2019.
14. Маркова Ю.А., Алексеев А.Л., Крамарский А.В., Савилов Е.Д. Растения как одно из звеньев цепи циркуляции патогенных для человека бактерий в окружающей среде. *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)*. 2012; 114(7): 11-4.
15. Дунаева С.Е., Оследкин Ю.С. Бактериальные микроорганизмы, ассоциированные с тканями растений в культуре *in vitro*: идентификация и возможная роль (обзор). *Сельскохозяйственная микробиология*. 2015; 50(1): 3-15. DOI: <http://doi.org/10.15389/agrobiol.2015.1.3rus>
16. Rio R.V.M., Attardo G.M., Weiss B.L. Grandeur alliances: symbiont metabolic integration and obligate arthropod hematophagy. *Trends Parasitol.* 2016; 32(9): 739-49. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.pt.2016.05.002>
17. Khaosaad T., Garcia-Garrido J.M., Steinkellner S., Vierheilig H. Take all disease is systemically reduced in roots of mycorrhizal barley plants. *Soil Biol. Biochem.* 2007; 39(3): 727-34. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.09.014>
18. Thomas P., Swarna G.K., Roy P.K., Prakash P. Identification of culturable and originally non-culturable endophytic bacteria isolated from shoot tip cultures of banana cv. Grand Naine. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 2008; 93(1): 55-63. DOI: <http://doi.org/10.1007/s11240-008-9341-9>
19. Гриценко В.А., Иванов Ю.Б. Роль персистентных свойств микроорганизмов в патогенезе эндогенных бактериальных инфекций. *Вестник Уральской медицинской академической науки*. 2009; (2): 35-9.
20. van Rood J.J., Persijn G.G., van Leeuwen A., Goulmy E., Gabb B.W. A new strategy to improve kidney graft survival: the induction of CML nonresponsiveness. *Transplant. Proc.* 1979; 11(1): 736-42.
21. Учайкин В.Ф. Решенные и нерешенные проблемы инфекционной патологии у детей. *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского*. 2004; 83(4): 7-11.
22. Бухарин О.В. Симбиотические взаимоотношения микроорганизмов при инфекции. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2013; 90(1): 93-7.
23. Mergaert P., Uchiuni T., Alunni B., Evanno G., Cheron A., Catrice O., et al. Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the rhizobium-legume symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006; 103(13): 5230-5. DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.0600912103>
24. Томова А.С., Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Роль фактора некроза опухли во взаимодействии макро- и микроорганизмов. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2005; (1): 24-9.

25. Соколенко А.В. Некультивируемые формы бактерий: распространение в природе, индукторы некультивируемого состояния и реверсии. *Современные наукоемкие технологии*. 2006; (2): 11-5.
26. Teixeira V., Feio M.J., Bastos M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Prog. Lipid Res.* 2012; 51(2): 149-77.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.12.005>
27. Лахтин М.В., Лахтин В.М., Аleshкин В.А., Афанасьев С.С. Фундаментальные аспекты и прикладные принципы лектиновых систем на примере микробиоценозных симбиотических штаммов и консорциумов. *Acta Biomedica Scientifica*. 2017; 2(2): 80-4.
28. Крыжановский Г.Н., ред. *Дисрегуляторная патология*. М.: Медицина; 2002: 366-85.
29. Подгорский В.С., Коваленко Э.А., Карпова И.С., Сащук Е.В., Гетьман Е.И. Внеклеточные лектины сапрофитных штаммов бактерий рода *Bacillus* (обзор). *Прикладная биохимия и микробиология*. 2014; 50(3): 256-63.
DOI: <http://doi.org/10.7868/S0555109914030283>
11. Voevodin D.A., Rozanova G.N., Poddubikov A.V., Mikhaylova N.A. Microbiocenosis, immune system and heredity. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2017; 94(2): 116-26. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2017-2-116-126> (in Russian)
12. Tyuziko I.A., Kalinchenko S.Yu., Vorslov L.O., Grekov E.A. Correction of androgen deficiency in chronic infectious prostatitis as pathogenetic method of overcoming inefficiencies standard antibiotics against the growing antibiotic resistance. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya*. 2013; 14(1): 55-63. (in Russian)
13. Mukhina A.Yu., Svishcheva M.V., Medvedeva O.A., Kalutskiy P.V., Shevchenko A.V., Bobyntsev I.I., et al. Application of peptide Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro (Selang) for dysbiosis correction under chronic immobilization stress. Patent RF № 2681217; 2019. (in Russian)
14. Markova Yu.A., Alekseenko A.L., Kramarskiy A.V., Savilov E.D. Plants as an element of environmental chain circulation of pathogenic for human bacteria. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk)*. 2012; 114(7): 11-4. (in Russian)
15. Dunaeva S.E., Osledkin Yu.S. Bacterial microorganisms associated with the plant tissue culture: identification and possible role (review). *Sel'skokhozyaystvennaya mikrobiologiya*. 2015; 50(1): 3-15. DOI: <http://doi.org/10.15389/agrobiology.2015.1.3eng>
16. Rio R.V.M., Attardo G.M., Weiss B.L. Grandeur alliances: symbiont metabolic integration and obligate arthropod hematophagy. *Trends Parasitol.* 2016; 32(9): 739-49.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.pt.2016.05.002>
17. Khaosaad T., Garcia-Garrido J.M., Steinkellner S., Vierheilig H. Take all disease is systemically reduced in roots of mycorrhizal barley plants. *Soil Biol. Biochem.* 2007; 39(3): 727-34.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.09.014>
18. Thomas P., Swarna G.K., Roy P.K., Prakash P. Identification of culturable and originally non-culturable endophytic bacteria isolated from shoot tip cultures of banana cv. Grand Naine. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 2008; 93(1): 55-63.
DOI: <http://doi.org/10.1007/s11240-008-9341-9>
19. Gritsenko V.A., Ivanov Yu.B. The role of persistent features of microorganisms in pathogenesis of endogenous infections. *Vestnik Ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki*. 2009; (2): 35-9. (in Russian)
20. van Rood J.J., Persijn G.G., van Leeuwen A., Goulmy E., Gabb B.W. A new strategy to improve kidney graft survival: the induction of CML nonresponsiveness. *Transplant. Proc.* 1979; 11(1): 736-42.
21. Uchaykin V.F. Solved and unresolved problems of infections pathology in children. *Pediatriya. Zhurnal im. G.N. Speranskogo*. 2004; 83(4): 7-11. (in Russian)
22. Bukharin O.V. Symbiotic interactions of microorganisms during infection. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2013; 90(1): 93-7. (in Russian)
23. Mergaert P., Uchiumi T., Alunni B., Evanno G., Cheron A., Catrice O., et al. Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the rhizobium-legume symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006; 103(13): 5230-5.
DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.0600912103>
24. Tomova A.S., Romanova Yu.M., Gintsburg A.L. The role of tumor necrosis factor- α in the interaction between the macro- and microorganism. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2005; (1): 24-9. (in Russian)
25. Sokolenko A.V. Uncultivated forms of bacteria: spread in nature, inductors of uncultivated condition and backward mutation. *Sovremennye naukoemkie tekhnologii*. 2006; (2): 11-5. (in Russian)
26. Teixeira V., Feio M.J., Bastos M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Prog. Lipid Res.* 2012; 51(2): 149-77.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.12.005>
27. Lakhtin M.V., Lakhtin V.M., Aleshkin V.A., Afanas'ev S.S. Fundamental aspects and practical principles of lectin systems on

REFERENCES

1. Bukharin O.V., ed. *Associative Symbiosis [Assotsiativnyy simbioz]*. Ekaterinburg; 2007. (in Russian)
2. Rozanova G.N., Voevodin D.A. A case of an effective application of probiotics in the complex therapy of severe type 1 diabetes mellitus and intestinal disbiosis. *Klinicheskaya meditsina*. 2008; 86(1): 67-8. (in Russian)
3. Voevodin D.A., Rozanova G.N., Stenina M.A., Skripnik A.Yu., Cheredeev A.N. The role of immunological responses in the adaptive process in children with diabetes mellitus type 1, phylogenetic concept of anti-stress adaptation. *Immunologiya*. 2003; 24(2): 103-7. (in Russian)
4. Fomina L.O., Zurochka V.A., Simbirtsev A.S., Gritsenko V.A. Influence of time of cultivation of *Staphylococcus aureus* on the production of cytokine-like substances that detected by ELISA. *Rossiyskiy immunologicheskij zhurnal*. 2018; 12(3): 454-9. DOI: <http://doi.org/10.31857/S102872210002427-4> (in Russian)
5. Zurochka A.V., Dukardt V.V., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Zueva E.B., Tyapaeva Ya.V., et al. Staphylococcus as producers of cytokine-like substances. *Rossiyskiy immunologicheskij zhurnal*. 2017; 11(2): 134-6. (in Russian)
6. Zurochka A.V., Dukardt V.V., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Zueva E.B., Tyapaeva Ya.V., et al. Bacteria as producers of cytokine-like substances. *Rossiyskiy immunologicheskij zhurnal*. 2017; 11(3): 374-6. (in Russian)
7. Zurochka A.V., Dukardt V.V., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Zueva E.B., Belozertseva Yu.P., et al. Staphylococcus aureus: spontaneous production of cytokine-like substances and regulation by synthetic analogue of the active centre of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *Byulleten' Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN*. 2017; (1): 3. (in Russian)
8. Bondarenko V.M., Maleev V.V., Likhoded V.G. Intestinal microflora, obesity and type 2 diabetes. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2014; 91(3): 42-9. (in Russian)
9. Rozanova G.N., Voevodin D.A., Stenina M.A., Kushnareva M.V. Pathogenetic role of dysbiosis in the development of complications of type 1 diabetes mellitus in children. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2002; 133(2): 196-8. DOI: <http://doi.org/10.1023/A:1015503006854> (in Russian)
10. Karaulov S.V., Afanas'ev S.S., Aleshkin V.A., Bondarenko L.N., Voropaeva E.A., Afanas'ev M.S., et al. Mechanisms of virulence acquisition of opportunistic microorganisms and nosocomial strains pool formation in mucosal microbiocenoses of open cavities of the body. *Astrakhanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2018; 13(2): 17-31. DOI: <http://doi.org/10.17021/2018.13.2.17.31> (in Russian)

- the example of symbiotic microbiocenosis strains and consortia. *Acta Biomedica Scientifica*. 2017; 2(2): 80-4. (in Russian)
28. Kryzhanovskiy G.N., ed. *Dysregulation Pathology [Disregulyatsionnaya patologiya]*. Moscow: Meditsina; 2002: 366-85. (in Russian)
29. Podgorskiy V.S., Kovalenko E.A., Karpova I.S., Sashchuk E.V., Get'man E.I. Extracellular lectin from saprophytic strains of bacteria of the genus *Bacillus* (Review). *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 2014; 50(3): 256-63. DOI: <http://doi.org/10.7868/S0555109914030283> (in Russian)

Информация об авторах:

Михайлова Наталья Александровна — д.м.н., проф., зав. лаб. протективных антигенов, зам. директора НИИВС им. И.И. Мечникова по научной работе, 105064, Москва, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6652-2093>.

Воеводин Дмитрий Анатольевич — к.м.н., в.н.с. лаб. протективных антигенов НИИВС им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2595-9168>.

E-mail: voevodin@instmech.ru

Лазарев Сергей Александрович — м.н.с. лаб. протективных антигенов НИИВС им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3206-6015>.

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

Information about authors:

Natalia A. Mikhailova — D. Sci. (Med.), Prof., Head, Laboratory of protective antigens, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6652-2093>.

Dmitry A. Voevodin — PhD (Med.), leading researcher, Laboratory of protective antigens, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2595-9168>.

E-mail: voevodin@instmech.ru

Sergey A. Lazarev — junior researcher, Laboratory of protective antigens, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3206-6015>.

Contribution: the authors contributed equally to this article.



Идентификация микроорганизмов с применением газовой хромато-масс-спектрометрии

Писанов Р.В., Шипко Е.С., Дуванова О.В., Симакова Д.И.✉

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, 344002, Ростов-на-Дону, Россия

В обзоре изложена основная информация, имеющаяся в литературе, об использовании метода газовой хромато-масс-спектрометрии. Обсуждены вопросы, затрагивающие значимость этого метода для идентификации микроорганизмов. Отмечена перспективность создания отечественного программного обеспечения и баз данных масс-спектров микроорганизмов.

Ключевые слова: идентификация микроорганизмов; жирные кислоты; хромато-масс-спектрометрия.

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках государственной темы № 209-4-19 «Изучение спектров жирных кислот как биомаркеров штаммов *Vibrio cholerae*».

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

Для цитирования: Писанов Р.В., Шипко Е.С., Дуванова О.В., Симакова Д.И. Идентификация микроорганизмов с применением газовой хромато-масс-спектрометрии. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(4): 356–362.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-8>

Поступила 17.10.2019

Принята в печать 28.05.2020

Identification of microorganisms using gas chromatography-mass spectrometry

Ruslan V. Pisanov, Elena S. Shipko, Olga V. Duvanova, Diana I. Simakova✉

Rostov-on-Don Antiplague Research Institute, 344002, Rostov-on-Don, Russia

The review presents the basic information available in literature on the use of gas chromatography-mass spectrometry. Issues concerning the significance of this method for the identification of microorganisms are discussed. The prospects of creating domestic software and databases of mass spectra of microorganisms are noted.

Keywords: identification of microorganisms; fatty acids; gas chromatography-mass spectrometry.

Acknowledgments. The work was carried out within the framework of the state theme No. 209-4-19 «Study of the spectra of fatty acids as biomarkers of *Vibrio cholerae* strains».

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

For citation: Pisanov R.V., Shipko E.S., Duvanova O.V., Simakova D.I. [Identification of microorganisms using gas chromatography-mass spectrometry]. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(4): 356–362. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-8>

Received 17 October 2019

Accepted 28 May 2020

Существует множество методов идентификации микроорганизмов (МО): фенотипические, генотипические, хемотаксономические методы, прямое белковое профилирование и др. [1]. Каждый из этих методов имеет свои достоинства и недостатки и применяется в зависимости от цели эксперимента.

Одним из современных методов, используемых для дифференциации и идентификации МО, является метод газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ/МС). Он основан на сочетании двух аналитических методов: капиллярной газовой хроматографии и масс-спектрометрии. Принцип метода —

качественное и количественное определение маркерных веществ МО (жирных кислот (ЖК), альдегидов, спиртов, стерина и др.) непосредственно в исследуемом материале.

Количественное газохроматографическое определение индивидуальных ЖК в биологических объектах является одним из наиболее востребованных методов аналитической и клинической биохимии: оно широко используется при оценке пищевой ценности продуктов питания, для таксономического и судебно-медицинского установления природы биологических образцов, в качестве источника информативных биомедицинских критериев в диагностике заболеваний разной этиологии, в научно-исследовательских, бактериологических и ветеринарных лабораториях [2]. Одной из перспектив применения газовой хроматографии в биомедицинских исследованиях является концепция метаболических профилей — систем интегральной оценки метаболизма как для макроорганизмов (метаболические профили биосред: мочи, крови, слюны, выдыхаемого воздуха), так и для МО. Метаболические профили так же индивидуальны, как и отпечатки пальцев [3].

Наличие специфических веществ (маркеров) в исследуемых образцах открывает возможность для направленного поиска и идентификации МО в сообществах с использованием метода ГХ/МС. Так, с определения маркера были начаты работы группы американских исследователей под руководством D.C. White [4], впоследствии изучивших структуру микробных сообществ [5] различных групп МО по известным маркерам без количественных определений видового состава сообщества. Установлено, что нечетные, разветвленные и циклопропановые ЖК, а также жирные альдегиды встречаются преимущественно у грамположительных бактерий, а высшие жирные β -оксикислоты присущи только грамотрицательным МО. К настоящему времени состав ЖК большинства МО III и IV групп патогенности изучен [6–13], показана его воспроизводимость, доказаны родо- и видоспецифичность ЖК [14].

Разработанный Г.А. Осиповым алгоритм [14] позволил не только рассчитать качественный и количественный состав микробного сообщества, в том числе МО III–IV групп патогенности, в биотопах человека, но и следить за изменением его состава, отслеживая изменения метаболизма МО методом ГХ/МС.

Идентификация МО путем получения профиля ЖК включает в себя несколько последовательных этапов:

- рост и накопление бактерий в определенных условиях;
- омыление клеточных липидов;
- метилирование ЖК;
- экстракцию и очистку метиловых эфиров ЖК;

- разделение метиловых эфиров ЖК газовой хроматографией;
- идентифицирование и количественное определение пиков.

Полученные профили можно сравнить с серией библиотек профилей и списком бактерий с наиболее похожими профилями, представленными вместе с расчетом относительного сходства. За рубежом продаются подобные системы, например система микробиологической идентификации «Sherlock» («MIDI Inc. Delaware», США), запущенная в 1991 г. для быстрой идентификации более 1500 видов МО путем анализа ЖК и альдегидов [15]. Программное обеспечение позволяет автоматизировать газовую хроматографию. Метод хорошо себя зарекомендовал; результаты, полученные путем ГХ/МС-анализа, были аналогичными данным, полученным с использованием молекулярно-биологических методов исследования.

Необходимо отметить, что значимость системы микробиологической идентификации зависит от вида исследуемого МО. Наибольшая сложность возникает при проведении внутривидовой межштаммовой дифференциации. Высокая степень варибельности ЖК-состава либо высокая гомология спектров ЖК изолятов одного вида не всегда позволяют провести внутривидовую дифференциацию [16, 17]. Поэтому в настоящее время для идентификации МО, помимо ЖК, в качестве биомаркеров используют сахара, аминокислоты, нуклеозиды, органические кислоты и некоторые вторичные метаболиты. Также следует учитывать тот факт, что на фенотипическую экспрессию ЖК в клеточных стенках бактерий или клеточных мембранах влияет целый ряд факторов, включая состав среды, температуру культивирования и фазу роста. В связи с этим требуется строгая стандартизация протокола исследования.

В России на основе ГХ/МС также была разработана и внедрена в практику комплексная автоматизированная хемотаксономическая система для обнаружения патогенных бактерий, возбудителей острых кишечных инфекций в продуктах питания по профилю ЖК [18]. Подобно работе с использованием системы микробиологической идентификации «Sherlock», не исключен этап выделения чистых культур с помощью селективных питательных сред. Авторами была создана отечественная база данных по ЖК для более чем 200 микробов, принадлежащих к 12 родам (*Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Campylobacter*, *Escherichia*, *Listeria*, *Yersinia*, *Staphylococcus*, *Francisella*). В настоящее время метод ГХ/МС с анализом спектра ЖК успешно используется для описания и характеристики патогенных бактерий III–IV групп [14].

В то же время сведений о применении данного подхода для идентификации возбудителей особо

опасных инфекционных заболеваний мало. В частности, в отношении возбудителя холеры в доступной литературе обнаружена работа американских авторов [19], в которой была предпринята попытка провести межвидовую дифференциацию представителей семейства *Vibrionaceae* по наличию или отсутствию гидроксид-, разветвленных, циклопропановых и ненасыщенных ЖК. В эксперимент были взяты 16 представителей семейства, которые в процессе анализа были разделены на 12 групп. Низкая специфичность метода могла быть обусловлена недостаточно полной на тот момент базой данных молекулярных маркеров МО. В настоящее время такая база данных включает информацию по ЖК, спиртам, стеролам и другим биологически активным соединениям МО (более 200 позиций), что является достаточно для определения таксономической принадлежности МО на уровне рода, а иногда и вида.

Т.Е. Кузьменко с соавт. [20] исследовали состав ЖК свободных липидов у 3 штаммов *Vibrio cholerae* O1: 1 штамма El Tor и 2 штаммов классического биовара. Следует отметить, что немногочисленные работы по попытке изучения состава ЖК у холерных вибрионов проводились на разном оборудовании с применением различных методических приемов выделения и идентификации без стандартизации условий культивирования МО, что не позволяло адекватно интерпретировать полученные результаты.

В 1996 г. группой исследователей была проведена идентификация двух клинических изолятов *F. tularensis* от пациентов с пневмонией. При сравнении спектров ЖК с применением базы данных MIDI была подтверждена их видовая принадлежность и обнаружены межштаммовые различия. В данном исследовании показано, что дискриминирующая способность метода ГХ/МС аналогична методу полногеномного секвенирования [21].

Т.Т. Inglis и соавт. [22] показали возможность дифференциации близкородственных штаммов — *Burkholderia pseudomallei* и *Burkholderia thailandensis*. В результате проведенного исследования показано, что в состав клеток штамма *B. pseudomallei*, вызывающего мелиоидоз, входит 2-гидрокситетрадекановая кислота. Данная кислота отсутствует в составе клеток непатогенного штамма *B. thailandensis*.

Разрешающая способность метода ГХ/МС для дифференциации представителей рода *Yersinia* показана в работе A. Leclercq и соавт. [16]. Анализ соотношения ЖК (12:0/16:0 и 14:0/16:0) позволил разделить род *Yersinia* на 3 кластера: непатогенные иерсинии; патогенные изоляты *Yersinia enterocolitica*; *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia pestis*. При анализе 29 штаммов *Y. pestis* были выявлены основные ЖК: 12:0, 14:0, 3-ОН-14:0, 16:0, 16:1ω9-цис, 17:0-цис и 18:1ω9-транс. Авторы отметили, что состав

ЖК штаммов *Y. pestis* был достаточно однороден и не зависел от биотипа, риботипа и эпидемиологических характеристик.

В 2000 г. группа исследователей применила метод ГХ/МС для сравнения ЖК-спектров спорных и вегетативных клеток аэробных бацилл, образующих эндоспору (роды *Bacillus*, *Paenibacillus* и *Brevibacillus*). В ходе исследования была продемонстрирована высокая воспроизводимость метода ГХ/МС. Показано, что как в спорных, так и в вегетативных формах преобладают разветвленные насыщенные ЖК. При этом содержание насыщенных ЖК в спорных формах значительно выше, чем в вегетативных. По мнению авторов, анализ спектра ЖК может быть дополнительным инструментом при проведении хемотаксономического анализа аэробных бацилл [23]. Метод ГХ/МС был успешно использован для исследования неизвестных порошков на предмет наличия спор сибирской язвы [24].

Кроме исследования ЖК-состава мембран, метод ГХ/МС широко используется для характеристики липополисахарида (ЛПС). Установлено, что, имея общую структуру ЛПС, липид А у разных представителей грамотрицательных бактерий отличается по головным заместителям, количеству и составу ЖК. В зависимости от вида МО состав липида А может варьировать от 4 ЖК (*Francisella tularensis*, *Helicobacter pylori*, *Pseudoalteromonas issachenkonii* КММ 3549Т), образуя тетраацилированные формы липида А, до 7 ЖК — гептаацилированные варианты липида А (*Erwinia carotovora* и *Acinetobacter radioresistens* S13). Большинство гексаацилированных молекул липида А имеют асимметричное распределение ЖК между глюкозаминами дисахарида липида А. Симметричное (2 + 2) распределение ЖК обнаружено в липиде А из *Coxiella burnetii* и некоторых гексаацилированных (3 + 3) структурах. В составе эндотоксинов из морских бактерий *Pseudoalteromonas haloplanktis* ТАС 125 и *Alteromonas addita* КММ 3600Т идентифицированы пентаацилированные структуры липида А [25–27].

N. Phillips с соавт. [28] провели исследование модификаций липида А ЛПС возбудителя туляремии. В работе были использованы 2 штамма: *F. tularensis* LVS (ATCC 29684) с ранее изученным жирнокислотным профилем липида А и *F. tularensis* 1547-57 (тип В). При использовании метода ГХ/МС показано, что штамм *F. tularensis* 1547-57 (тип В) имеет схожий с *F. tularensis* LVS ЖК-состав липида А, но дополнительно содержит в составе длинноцепочечные ЖК ($C_{20:0}$, $C_{22:0}$, $C_{24:0}$). В ходе дальнейшего исследования липида А было показано присутствие в нем галактозамина. По мнению авторов, данная модификация липида А может влиять на устойчивость бактерии к действию антимикробных пептидов. Применение метода ГХ/МС позволило выявить

молекулярные маркеры природного и вакцинного штаммов туляремии микроба.

В диагностических целях используется мультиионный метод ГХ/МС-анализа *in situ*, созданный отечественными исследователями, который позволяет проводить идентификацию возбудителя непосредственно в биологическом материале (мокрота, гнойный экссудат, биоптаты тканей и др.), минуя стадию выделения чистой культуры. Данный метод предусматривает проведение идентификации по 150 микробным маркерам одновременно, что делает анализ на основе ГХ/МС экспрессным методом диагностики [29].

Метод ГХ/МС может быть использован для реконструкции видового состава и структуры экологических сообществ МО [3], позволяя определять состав микробного сообщества не только качественно, но и количественно [30], включая патогенные МО в биотопах человека, а также следить за изменением состава микробиоценоза и отслеживать изменения метаболизма его участников [14, 31, 32]. Показана возможность применения газохроматографического анализа для определения наличия в пробах клинического материала возбудителей анаэробных инфекций [3]. При таком инфекционном процессе в пробах гноя, дренажной жидкости открытой раны накапливаются летучие ЖК С3–С6 (в том числе изомерные), тогда как при инфекции аэробного происхождения — уксусная кислота и нелетучие кислоты [3].

Изучение профиля ЖК позволяет получать данные о микробном сообществе некультивируемых МО при бактериологическом анализе.

Методы ГХ/МС могут быть успешно использованы в изучении адаптационных свойств МО. Спектр ЖК является фенотипической характеристикой бактериальной клетки. Вариации его состава позволяют судить об изменениях условий культивирования МО. В настоящее время наиболее изучен регуляторный механизм адаптации бактерий к температурному режиму окружающей среды [33, 34].

Клеточные мембраны бактерий представляют собой сложные гетерогенные системы, физико-химические свойства которых зависят от количественного и качественного состава липидных компонентов. Наглядным примером могут служить изменения вязкости мембран, ассоциированных со спектром ЖК, у бактерий рода *Yersinia*. Установлено, что повышение вязкости мембраны при снижении температуры культивирования обусловлено изменением физических свойств мембранных липидов, связанным со способностью МО модулировать спектр ЖК, входящих в состав фосфолипидов [33].

F. Chen и соавт. [35] изучили пути метаболизма двух штаммов возбудителя туляремии: *F. tularensis* subsp. *holarctica* (патогенный для человека) и *F. tularensis* subsp. *novicida* (непатогенный для чело-

века). При изучении ГХ/МС-методом профиля изотопологов аминокислот, полисахаридного деривата глюкозы, фруктозы, аминсахаров, ЖК, 3-гидроксисубтирата, лактата, сукцината и малата показано, что штаммы в различной степени используют данные субстраты. По мнению авторов исследования, различия в использовании субстратов могут быть связаны с вирулентностью штаммов и их персистенцией в организме хозяина и переносчика.

Одним из ключевых моментов при проведении ГХ/МС является анализ полученных данных. Подход основан на анализе времени выхода вещества и наличия нескольких значимых ионов. Данный метод анализа является наиболее точным и дает наилучшие результаты, однако сильно зависит от используемого оборудования — одно и то же вещество будет иметь разное время удержания при применении разных колонок. Это делает практически невозможным использование данных, полученных другими авторами, и требует создания баз данных именно на «своем» оборудовании. Помимо этого практически все базы данных содержат масс-спектры отдельных веществ, а не целых МО. Одной из возможных проблем использования зарубежного программного обеспечения и баз данных является зависимость от хаотичной санкционной политики зарубежных стран, что может привести к блокированию работы дорогостоящего импортного оборудования. Все это делает актуальными работы по созданию отечественного программного обеспечения, баз данных масс-спектров веществ и базы профилей МО для их идентификации с помощью ГХ/МС.

Выводы

Таким образом, ГХ/МС-метод характеризуют:

- высокая чувствительность (1×10^3 – 1×10^4 клеток в пробе) и достоверность, возможность использования в клинической диагностике;
- способность выявлять возбудителей инфекций, находящихся в «спящем» состоянии (микробиоты окупаны защитной полисахаридной капсулой);
- универсальность методики в отношении разных групп МО: бактерий, грибов, вирусов;
- экспрессность — полное время анализа составляет 2 ч;
- селективность — возможность идентификации МО до вида;
- использование любого биоматериала.

Метод лишен недостатков классических методов идентификации и дифференциации. Так, в отличие от бактериологических исследований ГХ/МС — экспрессный метод: отсутствуют стадии повторных пересевов и биохимических тестов, которые особенно сложны, трудоемки и длительны. Нет необходимости в получении чистой культуры;

возможна идентификация некультивируемых форм МО. В отличие от иммуносерологических исследований ГХ/МС — прямой метод: отсутствуют ошибочные определения, связанные с индивидуальными вариациями иммунного ответа; он также более чувствительный. В отличие от молекулярно-биологических методов дается адекватная количественная оценка; метод менее дорогой, для его реализации используются доступные любым лабораториям химические реактивы и методики пробоподготовки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Старостин К.В., Демидов Е.А., Розанов А.С., Брянская А.В., Пельтек С.Е. Исследование воспроизводимости результатов идентификации микроорганизмов с помощью метода МАЛДИ времяпролетной масс-спектрометрии в зависимости от условий культивирования на примере *Geobacillus stearothermophilus*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013; 17(4-1): 748-57.
2. Ариповский А.В., Колесник П.О., Кулагина Т.П., Титов В.Н. Подготовка проб для газохроматографического определения жирных кислот: преимущества безэкстракционного метода с прямой перэтерификацией липидов высушенных биологических проб. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(3): 141-7.
DOI: <http://doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-3-141-147>
3. Хутаков Р.В., Саганов В.П., Раднаева Л.Д., Дамбаев Г.Ц., Хитрихеев В.Е., Доржиев Т.Э. Использование метода газовой хроматографии в диагностике и лечении больных острым холециститом (обзор литературы). *Вестник Бурятского государственного университета*. 2015; (12): 164-9.
4. Bobbie R.J., White D.C. Characterization of benthic microbial community structure by high-resolution gas chromatography of fatty acid methyl esters. *Appl. Environ. Microbiol.* 1980; 39(6): 1212-22.
5. Nichols P.D., Mancuso C.A., White D.C. Measurement of methanotroph and methanogen signature phospholipids for use in assessment of biomass and community structure in model system. *Org. Geochem.* 1987; 11(6): 451-61.
DOI: [http://doi.org/10.1016/0146-6380\(87\)90002-7](http://doi.org/10.1016/0146-6380(87)90002-7)
6. Попов Д.А., Овсиенко С.Т., Осипов Г.А., Вострикова Т.Ю. Ускоренный способ идентификации возбудителей бактериемий с применением метода газовой хромато-масс-спектрометрии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; (5): 54-8.
7. Birnbaum D., Herwaldt L., Low D.E., Noble M., Pfaller M., Sherertz R., et al. Efficacy of microbial identification system for epidemiologic typing of coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32(9): 2113-9.
8. Hoffmann M., Fischer M., Whittaker P. Evaluating the use of fatty acid profiles to identify deep-sea *Vibrio* isolates. *Food Chem.* 2010; 122(4): 943-50.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.015>
9. Huys G., Vancanneyt M., Coopman R., Janssen P., Falsen E., Altwegg M., et al. Cellular fatty acid composition as a chemotaxonomic marker for the differentiation of phenospecies and hybridization groups in the genus *Aeromonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1994; 44(4): 651-8. DOI: <http://doi.org/10.1099/00207713-44-4-651>
10. Livesley M.A., Thompson I.P., Bailey M.J., Nuttall P.A. Comparison of the fatty acid profiles of *Borrelia*, *Serpulina* and *Leptospira* species. *J. Gen. Microbiol.* 1993; 139(4): 889-95.
DOI: <http://doi.org/10.1099/00221287-139-4-889>
11. Whittaker P., Fry F.S., Curtis S.K., Al-Khaldi S.F., Mossoba M.M., Yurawecz M.P., et al. Use of fatty acid profiles to identify food-borne bacterial pathogens and aerobic endospore-forming bacilli. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53(9): 3735-42.
DOI: <http://doi.org/10.1021/jf040458a>
12. Wu H.Y., Yan H., Zheng M.L., Sun M.M., Wang Q., Hu C.M., et al. *Legionella qingyii* sp. nov., isolated from water samples in China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2019; 69(7): 2017-22.
DOI: <http://doi.org/10.1099/ijsem.0.003421>
13. Zayed M.E. Identification of two fungicide degrading *Pseudomonas* species by gas chromatography of cellular fatty acids. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 2004; 69(4): 779-88.
14. Верховцева Н.В., Осипов Г.А. Метод газовой хроматографии—масс-спектрометрии в изучении микробных сообществ почв агроценоза. *Проблемы агрохимии и экологии*. 2008; (1): 51-4.
15. Kunitsky C., Osterhout G., Sasser M. Identification of microorganisms using fatty acid methyl esters (FAME) analysis and the MIDI Sherlock® Microbial Identification System. In: *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods. Volume 3*. Bethesda: Parenteral Drug Association; 2006: 1-18.
16. Leclercq A., Guiyoule A., El Lioui M., Carniel E., Decallonne J. High homogeneity of the *Yersinia pestis* fatty acid composition. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(4): 1545-51.
17. Whittaker P. Comparison of *Yersinia pestis* to other closely related *Yersinia* species using fatty acid profiles. *Food Chemistry*. 2009; 116(3): 629-32.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.073>
18. Комаров Г.Д., Помазанов В.В., Порсиус Н. Способ обнаружения и идентификации микроорганизмов. Заявка на изобретение № 97108375; 1997.
19. Lambert M.A., Hickman-Brenner F.W., Farmer Hi J.J., Moss C.W. Differentiation of Vibrionaceae species by their cellular fatty acid composition. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1983; 33(4): 777-92.
DOI: <http://doi.org/10.1099/00207713-33-4-777>
20. Кузьменко Т.Е., Головня Р.В., Воронова Е.А. Исследование состава высших жирных кислот свободных липидов *Vibrio cholerae*. *Биоорганическая химия*. 1980; 6(1): 90-8.
21. Clarridge J.E. 3rd, Raich T.J., Sjusted A., Sandstrom G., Darouiche R.O., Shawar R.M., et al. Characterization of two unusual clinically significant Francisella strains. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34(8): 1995-2000.
22. Inglis T.J.J., Aravena-Roman M., Ching S., Croft K., Wuthikannun V., Mee B.J. Cellular fatty acid profile distinguishes *Burkholderia pseudomallei* from avirulent *Burkholderia thailandensis*. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(10): 4812-4.
DOI: <http://doi.org/10.1128/jcm.41.10.4812-4814.2003>
23. Song Y., Yang R., Guo Z., Zhang M., Wang X., Zhou F. Distinctness of spore and vegetative cellular fatty acid profiles of some aerobic endospore-forming bacilli. *J. Microbiol. Methods*. 2000; 39(3): 225-41. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0167-7012\(99\)00123-2](http://doi.org/10.1016/S0167-7012(99)00123-2)
24. Wills B., Leikin J., Rhee J., Saeedi B. Analysis of suspicious powders following the post 9/11 anthrax scare. *J. Med. Toxicol.* 2008; 4(2): 93-5. DOI: <http://doi.org/10.1007/bf03160961>
25. Кабанов Д.С., Прохоренко И.Р. Структурный анализ липополисахаридов грамотрицательных бактерий (обзор). *Биохимия*. 2010; 75(4): 469-91.
26. Корнеев К.В., Кондакова А.Н., Арбатский Н.П., Новотоцкая-Власова К.А., Ривкина Е.М., Анисимов А.П. и др. Различия в биологической активности липополисахаридов в зависимости от степени ацилирования липида А из мутантных штаммов *Yersinia pestis* и бактерий рода *Psychrobacter*. *Биохимия*. 2014; 79(12): 1629-35.
27. Park B.S., Song D.H., Kim H.M., Choi B.S., Lee H., Lee J.O. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*. 2009; 458: 1191-5.
DOI: <http://doi.org/10.1038/nature07830>
28. Phillips N.J., Schilling B., McLendon M.K., Apicella M.A., Gibson B.W. Novel modification of lipid A of *Francisella tularensis*. *Infect. Immun.* 2004; 72(9): 5340-8.
DOI: <http://doi.org/10.1128/IAI.72.9.5340-5348.2004>
29. Осипов Г.А. Хромато-масс-спектрометрический анализ микроорганизмов и их сообществ в клинических пробах при инфекциях и дисбиозах. В кн.: *Химический анализ в медицинской диагностике*. М.: Наука; 2010: 293-368.
30. Шумилова Л.П., Куимова Н.Г. Изучение микробного сообщества городских почв методом газовой хроматографии—масс-спектрометрии. *Бюллетень физиологии и патологии дыхания*. 2013; (50): 121-5.
31. Верховцева Н.В., Ларина Г.Е., Спиридонов Ю.Я., Степанов А.Л., Осипов Г.А. Микробные консорциумы почв агроценозов разных природных зон России с учетом их сельскохозяйственного использования. *Проблемы агрохимии и экологии*. 2008; (2): 37-43.
32. Полеско И.В., Осипов Г.А., Кабаева Т.И. Микроэкология организма человека при себорее и акне. *Детские инфекции*. 2006; 5(3): 26-33.

33. Андрюков Б.Г., Сомова Л.М., Тимченко Н.Ф. Жирные кислоты как объект исследования температурных адаптационных стратегий микроорганизмов-психрофилов. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2015; (3): 43-9.
34. Сомова Л.М., Бузалева Л.С., Плехова Н.Г. *Ультроструктура патогенных бактерий в разных экологических условиях*. Владивосток: Медицина ДВ; 2009.
35. Chen F., Rydzewski K., Kutzner E., Häuslein I., Schunder E., Wang X., et al. Differential substrate usage and metabolic fluxes in *Francisella tularensis* subspecies holarctica and *Francisella novicida*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2017; (7): 275. DOI: <http://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00275>

REFERENCES

1. Starostin K.V., Demidov E.A., Rozanov A.S., Bryanskaya A.V., Pel'tek S.E. Reproducibility of the results of microbe identification by MALDI-TOF mass spectrometry depending on growth conditions by the example of *Geobacillus stearothermophilus*. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii*. 2013; 17(4-1): 748-57. (in Russian)
2. Aripovskiy A.V., Kolesnik P.O., Kulagina T.P., Titov V.N. Preparation of samples for gas-chromatographic determination of fatty acids: direct transesterification of lipids of a dry biological sample is preferred in comparison with the methods employing preliminary lipid extraction. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2018; 63(3): 141-7. DOI: <http://doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-3-141-147> (in Russian)
3. Khutakov R.V., Saganov V.P., Radnaeva L.D., Dambaev G.Ts., Khitrikheev V.E., Dorzhiev T.E. Use of gas chromatography method in the diagnosis and treatment of patients with acute cholecystitis (a review of references). *Vestnik Buryatskogo gosudarstvennogo universiteta*. 2015; (12): 164-9. (in Russian)
4. Bobbie R.J., White D.C. Characterization of benthic microbial community structure by high-resolution gas chromatography of fatty acid methyl esters. *Appl. Environ. Microbiol.* 1980; 39(6): 1212-22.
5. Nichols P.D., Mancuso C.A., White D.C. Measurement of methanotroph and methanogen signature phospholipids for use in assessment of biomass and community structure in model system. *Org. Geochem.* 1987; 11(6): 451-61. DOI: [http://doi.org/10.1016/0146-6380\(87\)90002-7](http://doi.org/10.1016/0146-6380(87)90002-7)
6. Popov D.A., Ovsienko S.T., Osipov G.A., Vostrikova T.Yu. The express mode of identification of agents of bacteriemias using the technique of gas chromatography-mass spectrometry. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2013; (5): 54-8. (in Russian)
7. Birnbaum D., Herwaldt L., Low D.E., Noble M., Pfaller M., Sherrert R., et al. Efficacy of microbial identification system for epidemiologic typing of coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32(9): 2113-9.
8. Hoffmann M., Fischer M., Whittaker P. Evaluating the use of fatty acid profiles to identify deep-sea *Vibrio* isolates. *Food Chem.* 2010; 122(4): 943-50. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.015>
9. Huys G., Vancanneyt M., Coopman R., Janssen P., Falsen E., Altwegg M., et al. Cellular fatty acid composition as a chemotaxonomic marker for the differentiation of phenospecies and hybridization groups in the genus *Aeromonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1994; 44(4): 651-8. DOI: <http://doi.org/10.1099/00207713-44-4-651>
10. Livesley M.A., Thompson I.P., Bailey M.J., Nuttall P.A. Comparison of the fatty acid profiles of *Borrelia*, *Serpulina* and *Leptospira* species. *J. Gen. Microbiol.* 1993; 139(4): 889-95. DOI: <http://doi.org/10.1099/00221287-139-4-889>
11. Whittaker P., Fry F.S., Curtis S.K., Al-Khaldi S.F., Mossoba M.M., Yurawecz M.P., et al. Use of fatty acid profiles to identify food-borne bacterial pathogens and aerobic endospore-forming bacilli. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53(9): 3735-42. DOI: <http://doi.org/10.1021/jf040458a>
12. Wu H.Y., Yan H., Zheng M.L., Sun M.M., Wang Q., Hu C.M., et al. *Legionella qingyii* sp. nov., isolated from water samples in China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2019; 69(7): 2017-22. DOI: <http://doi.org/10.1099/ijsem.0.003421>
13. Zayed M.E. Identification of two fungicide degrading *Pseudomonas* species by gas chromatography of cellular fatty acids. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 2004; 69(4): 779-88.
14. Verkhovtseva N.V., Osipov G.A. Method of the gas-chromatography-mass-spectrometry in studying of the soil microbial communities. *Problemy agrokhimii i ekologii*. 2008; (1): 51-4. (in Russian)
15. Kunitzky C., Osterhout G., Sasser M. Identification of microorganisms using fatty acid methyl esters (FAME) analysis and the MIDI Sherlock® Microbial Identification System. In: *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods. Volume 3*. Bethesda: Parenteral Drug Association; 2006: 1-18.
16. Leclercq A., Guiyoule A., El Lioui M., Carniel E., Decallonne J. High homogeneity of the *Yersinia pestis* fatty acid composition. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(4): 1545-51.
17. Whittaker P. Comparison of *Yersinia pestis* to other closely related *Yersinia* species using fatty acid profiles. *Food Chemistry*. 2009; 116(3): 629-32. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.073>
18. Komarov G.D., Pomazanov V.V., Porsius N. Method of detection and identification of microorganisms. Application for invention № 97108375; 1997. (in Russian)
19. Lambert M.A., Hickman-Brenner F.W., Farmer Hi J.J., Moss C.W. Differentiation of *Vibrionaceae* species by their cellular fatty acid composition. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1983; 33(4): 777-92. DOI: <http://doi.org/10.1099/00207713-33-4-777>
20. Kuz'menko T.E., Golovnya R.V., Voronova E.A. A composition of higher fatty acids of *Vibrio cholerae* free lipids. *Bioorganicheskaya khimiya*. 1980; 6(1): 90-8. (in Russian)
21. Clarridge J.E. 3rd, Raich T.J., Sjosted A., Sandstrom G., Darouiche R.O., Shawar R.M., et al. Characterization of two unusual clinically significant *Francisella* strains. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34(8): 1995-2000.
22. Inglis T.J.J., Aravena-Roman M., Ching S., Croft K., Wuthiekanun V., Mee B.J. Cellular fatty acid profile distinguishes *Burkholderia pseudomallei* from avirulent *Burkholderia thailandensis*. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(10): 4812-4. DOI: <http://doi.org/10.1128/jcm.41.10.4812-4814.2003>
23. Song Y., Yang R., Guo Z., Zhang M., Wang X., Zhou F. Distinctness of spore and vegetative cellular fatty acid profiles of some aerobic endospore-forming bacilli. *J. Microbiol. Methods*. 2000; 39(3): 225-41. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0167-7012\(99\)00123-2](http://doi.org/10.1016/S0167-7012(99)00123-2)
24. Wills B., Leikin J., Rhee J., Saedi B. Analysis of suspicious powders following the post 9/11 anthrax scare. *J. Med. Toxicol.* 2008; 4(2): 93-5. DOI: <http://doi.org/10.1007/bf03160961>
25. Kabanov D.S., Prokhorenko I.R. Structural analysis of lipopolysaccharides from gram-negative bacteria. *Biokhimiya*. 2010; 75(4): 469-91. (in Russian)
26. Korneev K.V., Kondakova A.N., Arbatskiy N.P., Novototskaya-Vlasova K.A., Rivkina E.M., Anisimov A.P., et al. Distinct biological activity of lipopolysaccharides with different lipid acylation status from mutant strains of *Yersinia pestis* and some members of genus *Psychrobacter*. *Biokhimiya*. 2014; 79(12): 1629-35. (in Russian)
27. Park B.S., Song D.H., Kim H.M., Choi B.S., Lee H., Lee J.O. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*. 2009; 458: 1191-5. DOI: <http://doi.org/10.1038/nature07830>
28. Phillips N.J., Schilling B., McLendon M.K., Apicella M.A., Gibson B.W. Novel modification of lipid A of *Francisella tularensis*. *Infect. Immun.* 2004; 72(9): 5340-8. DOI: <http://doi.org/10.1128/IAI.72.9.5340-5348.2004>
29. Osipov G.A. Chromato-mass spectrometric analysis of microorganisms and their communities in clinical samples for infections and dysbiosis. In: *Chemical Analysis in Medical Diagnostics [Khimicheskiiy analiz v meditsinskoy diagnostike]*. Moscow: Nauka; 2010: 293-368. (in Russian)
30. Shumilova L.P., Kuimova N.G. The study of microbial association in city soils by the gas chromatography-mass spectrometry method. *Byulleten' fiziologii i patologii dykhaniya*. 2013; (50): 121-5. (in Russian)
31. Verkhovtseva N.V., Larina G.E., Spiridonov Yu.Ya., Stepanov A.L., Osipov G.A. Microbic consortia of different natural zones agroecosis soils of Russia discounting their agricultural use. *Problemy agrokhimii i ekologii*. 2008; (2): 37-43. (in Russian)
32. Polesko I.V., Osipov G.A., Kabaeva T.I. Microecology of the human body in seborrhea and acne. *Detskie infektsii*. 2006; 5(3): 26-33. (in Russian)
33. Andryukov B.G., Somova L.M., Timchenko N.F. Fatty acid as an object of research of temperature adaptation strategies psychro-

- philes. *Zdorov'e. Meditsinskaya ekologiya. Nauka*. 2015; (3): 43-9. (in Russian)
34. Somova L.M., Buzoleva L.S., Plekhova N.G. *Ultrastructure of Pathogenic Bacteria in Different Environmental Conditions [Ultrastruktura patogennykh bakteriy v raznykh ekologicheskikh usloviyakh]*. Vladivostok: Meditsina DV; 2009. (in Russian)
35. Chen F., Rydzewski K., Kutzner E., Häuslein I., Schunder E., Wang X., et al. Differential substrate usage and metabolic fluxes in *Francisella tularensis* subspecies holarctica and *Francisella novicida*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2017; (7): 275. DOI: <http://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00275>

Информация об авторах:

Писанов Руслан Вячеславович — к.б.н., в.н.с., и.о. зав. лаб. диагностики особо опасных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, 344002, Ростов-на-Дону, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7178-8021>.

Шипко Елена Сергеевна — м.н.с. лаб. диагностики особо опасных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, 344002, Ростов-на-Дону, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8517-2789>.

Дуванова Ольга Викторовна — к.б.н., с.н.с. лаб. диагностики особо опасных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, 344002, Ростов-на-Дону, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1702-1620>.

Симакова Диана Игоревна — к.б.н., н.с. лаб. диагностики особо опасных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, 344002, Ростов-на-Дону, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5598-5271>.
E-mail: 740_280@mail.ru

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

Information about the authors:

Ruslan V. Pisanov — PhD (Biol.), main researcher, Deputy Head, Laboratory of diagnostics of especially dangerous infections, Rostov-on-Don Antiplague Research Institute, 344002, Rostov-on-Don, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7178-8021>.

Elena S. Shipko — junior researcher, Laboratory of diagnostics of especially dangerous infections, Rostov-on-Don Antiplague Research Institute, 344002, Rostov-on-Don, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8517-2789>.

Olga V. Duvanova — PhD (Biol.), senior researcher, Laboratory of diagnostics of especially dangerous infections, Rostov-on-Don Antiplague Research Institute, 344002, Rostov-on-Don, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1702-1620>.

Diana I. Simakova — PhD (Biol.), researcher, Laboratory of diagnostics of especially dangerous infections, Rostov-on-Don Antiplague Research Institute, 344002, Rostov-on-Don, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5598-5271>.
E-mail: 740_280@mail.ru

Contribution: the authors contributed equally to this article.

НАУКА И ПРАКТИКА

© Фельдблюм И.В., Субботина К.А., Рычкова О.А., Миронов А.Н., Волкова Д.А., Метов А.О., Сакаева И.В., Купина Н.В., Карбышев М.С., Миронов Н.А., Кондратьева Я.Ю., 2020



Реактогенность, безопасность и иммунологическая эффективность вакцины для профилактики ротавирусной инфекции пентавалентной живой при иммунизации детей (результаты многоцентрового клинического исследования)

Фельдблюм И.В.^{1✉}, Субботина К.А.¹, Рычкова О.А.², Миронов А.Н.³, Волкова Д.А.¹, Метов А.О.⁵, Сакаева И.В.³, Купина Н.В.⁴, Карбышев М.С.⁵, Миронов Н.А.³, Кондратьева Я.Ю.⁴

¹ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера», 614990, Пермь, Россия;

²ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет», 625023, Тюмень, Россия;

³ООО «Национальное Агентство Лекарственных Средств», 119192, Москва, Россия;

⁴ООО «СиТиЭрФарм», 119311, Москва, Россия;

⁵ООО «ФАРМ ЭЙД ЛТД», 109004, Москва, Россия

Введение. Ротавирусная инфекция (РВИ) является наиболее распространенной причиной тяжелого гастроэнтерита у детей раннего возраста во всем мире: ежегодно 600 тыс. детей в мире умирают, около 3 млн нуждаются в госпитализации, 25 млн требуется врачебная помощь. Основной мерой борьбы с данной инфекцией признана вакцинопрофилактика. **Цель работы** — оценка реактогенности, безопасности и иммуногенности вакцины для профилактики РВИ пентавалентной живой при иммунизации детей.

Материалы и методы. В России впервые проведено многоцентровое проспективное рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое клиническое исследование вакцины для профилактики РВИ пентавалентной живой с участием здоровых детей в возрасте 2 мес на момент первой вакцинации.

Результаты. Вакцина характеризовалась удовлетворительным профилем безопасности и высокой иммунологической активностью при трехкратной иммунизации детей. Отрицательной динамики в состоянии здоровья детей в ходе наблюдения не выявлено.

Обсуждение. Показатели сероконверсии, фактора сероконверсии и средней геометрической титров антител были сопоставимы с результатами зарубежных исследований как данного препарата, так и его аналогов.

Ключевые слова: ротавирусная инфекция; дети; вакцина пентавалентная живая; иммуногенность; безопасность; реактогенность.

Источник финансирования. Исследование финансировалось в рамках клинического исследования «Вакцина для профилактики ротавирусной инфекции, пентавалентная, живая» (Разрешение Минздрава РФ от 29.01.2019 № 46).

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

Для цитирования: Фельдблюм И.В., Субботина К.А., Рычкова О.А., Миронов А.Н., Волкова Д.А., Метов А.О., Сакаева И.В., Купина Н.В., Карбышев М.С., Миронов Н.А., Кондратьева Я.Ю. Реактогенность, безопасность и иммунологическая эффективность вакцины для профилактики ротавирусной инфекции пентавалентной живой при иммунизации детей (результаты многоцентрового клинического исследования). *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2020; 97(4): 363–374.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-9>

Поступила 02.06.2020
Принята в печать 12.07.2020

Reactogenicity, safety and immunological efficacy of the live, pentavalent rotavirus vaccine in childhood immunization (results of the multicenter clinical trial)

Irina V. Feldblium¹✉, Kseniya A. Subbotina¹, Olga A. Rychkova², Aleksander N. Mironov³, Darya A. Volkova¹, Azamat O. Metov⁵, Irina V. Sakaeva³, Natalia V. Kupina⁴, Mikhail S. Karbyshev⁵, Nikita A. Mironov³, Yaroslava Yu. Kondratyeva⁴

¹Perm State Medical University named after Academician E.A. Wagner, 614990, Perm, Russia;

²Tyumen State Medical University, 625023, Tyumen, Russia;

³National Agency of Medicines, 119192, Moscow, Russia;

⁴CTR-Pharma, 119311, Moscow, Russia;

⁵Pharm Aid Ltd, 119311, Moscow, Russia

Introduction. Rotavirus infection (RVI) is the most common cause of severe gastroenteritis in infants and young children worldwide: 600,000 children die annually; it accounts for approximately 3 million hospitalizations and 25 million physician visits each year among children. Preventive vaccination is universally recognized as the most effective measure against this infection.

The purpose of the study is assessment of reactogenicity, safety and immunogenicity of the pentavalent live vaccine for RVI prevention in childhood immunization.

Materials and methods. The first multicenter prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of the pentavalent live vaccine for RVI prevention was conducted in Russia among healthy infants aged 2 months at the time of the first vaccination.

Results. The vaccine had a satisfactory safety profile and high immunologic activity when administered in a three-dose series for childhood immunization. No negative changes in the children's health condition were detected during the surveillance monitoring.

Discussion. The seroconversion rates, the seroconversion factor and the geometric mean antibody titer were consistent with the results obtained during trials of the above vaccine and its equivalents in other countries.

Keywords: rotavirus infection; children; live, pentavalent vaccine; immunogenicity; safety; reactogenicity.

Acknowledgments. The study was funded as part of the clinical study "Vaccine for the prevention of rotavirus infection, pentavalent, live" (Resolution of the Ministry of Health of the Russian Federation, January 29, 2019 No. 46).

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

For citation: Feldblium I.V., Subbotina K.A., Rychkova O.A., Mironov A.N., Volkova D.A., Metov A.O., Sakaeva I.V., Kupina N.V., Karbyshev M.S., Mironov N.A., Kondratyeva Ya.Yu. [Reactogenicity, safety and immunological efficacy of the live, pentavalent rotavirus vaccine in childhood immunization (results of the multicenter clinical trial)]. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(4): 363–374. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-9>

Received 2 June 2020

Accepted 12 July 2020

Введение

Ротавирусная инфекция (РВИ) — самая массовая кишечная инфекция практически во всем мире. По данным экспертов ВОЗ, среди 1,0–1,2 млрд «диарейных заболеваний», регистрируемых ежегодно, 49–67% приходится на вирусные инфекции [1, 2]. Столь широкое распространение РВИ определяется рядом факторов: невозможностью эффективного воздействия на возбудителя инфекции вследствие большого количества носителей и отсутствия этиотропной терапии, неконтролируемостью путей передачи, высокой контагиозностью возбудителя и недостаточной эффективностью дезинфицирующих средств [3–5]. В силу высокой контагиозности (у детей выделяется ≥ 10 млрд вирусных частиц/мл стула, минимальная заражающая доза — 10 бляшкообразующих единиц/мл) РВИ является одной из основных причин внутрибольничных диарей, доля которых в отдельные сезоны года может достигать 87% [6–9].

По данным экспертов ВОЗ, заболеваемость РВИ в различных странах колеблется в широких пределах: 250–3000 на 100 тыс. детей. Ежегодно в США наблюдается свыше 1 млн случаев тяжелых ротавирусных диарей среди пациентов в возрасте 1–4 года [10–13]. Массовые исследования в этой стране показали, что еще до начала программы вакцинации от РВИ 80% детей были серопозитивны, что свидетельствовало о ранее перенесенной ими инфекции. Аналогичные исследования, проведенные в Польше в 2008 г., подтвердили наличие РВИ практически у каждого третьего ребенка с острой кишечной инфекцией [14, 15].

По мнению ВОЗ, РВИ является ведущей причиной гастроэнтеритов у детей в возрасте младше 5 лет в странах как с низким, так и с высоким уровнем экономического развития. Достоверные различия имеет лишь показатель смертности, ее высокий уровень от РВИ наиболее характерен для развиваю-

щихся государств и достигает почти 82% смертельных случаев от РВИ на планете.

Проблема РВИ в экономически развитых странах стоит не менее остро. По оценкам европейских экспертов, на 23,6 млн детей младше 5 лет, проживающих в странах Евросоюза, ежегодно приходится 3,6 млн эпизодов ротавирусного гастроэнтерита, частота составляет 1 случай клинически значимой инфекции на 7 детей ежегодно [16]. В результате инфекции ежегодно погибает 231 ребенок, более 87 тыс. госпитализируются и еще около 700 тыс. обращаются за медицинской помощью. В странах Евросоюза смертность от данной инфекции невысока, но именно РВИ определяет высокую заболеваемость среди детского населения с наличием большого числа клинических форм, требующих госпитализации и обращения за неотложной помощью. Средняя продолжительность госпитализации составляет 2–10 дней, стоимость случая внутрибольничной РВИ — 1500 евро [15]. Доля ротавирусного гастроэнтерита в общем числе случаев острого гастроэнтерита у детей до 5 лет в европейских странах варьирует от 25,3% (Греция) до 63,5% (Норвегия). В других странах эта доля составляет 36–45% [16, 17].

В структуре детской смертности от вакциноконтролируемых заболеваний РВИ, по данным ВОЗ, занимает 2-е место после пневмококковой инфекции [18–21]. В 2011 г. инфекционная диарея стала причиной 9,9% из 6,9 млн смертей в данной возрастной группе, причем более 70% умерших были младше 2 лет [14, 18, 19]. Среди этиологически расшифрованных вирусных диарей РВИ выявляется в 65% случаев, причем ею обусловлены 17,8% смертельных диарей. Таким образом, ежегодно с ротавирусным гастроэнтеритом связано 197 тыс. смертей, т.е. каждый час от этой инфекции погибает 23 ребенка [14, 18, 20, 21].

В России в структуре острых кишечных инфекций более 50% случаев приходится на острые кишечные инфекции вирусной этиологии (рота- и норовирусные). Заболеваемость РВИ в России на протяжении последних 10 лет сохраняет тенденцию к росту и по итогам 2018 г. составила 81,3 на 100 тыс. населения. Очевидно, что одной из причин, обусловивших данную динамику, является улучшение качества лабораторной диагностики острых кишечных инфекций, что позволяет более детально обозначить основных возбудителей острых гастроэнтеритов у населения России [22]. Уровень вирусносительства у детей раннего возраста составляет 1,5–9,0% [23].

Основной мерой борьбы с этой инфекцией в мире признана вакцинопрофилактика. В настоящее время вакцинация против РВИ внедрена в 69 странах мира и включена в календари профилактических прививок США, Бельгии, Германии, Ав-

стрии, ряда стран Латинской Америки и др. [24–26]. Курс вакцинации состоит из 2–3 доз, вводимых внутрь с интервалом 4–8 нед в течение первых 6 мес жизни (одновременно с вакцинами против дифтерии, столбняка, коклюша, полиомиелита и гемофильной инфекции). Эффективность иммунизации достигает 70–80%, а в отношении форм, требующих госпитализации или внутривенной регидратации, — 100% [27, 28]. В Мексике применение вакцины против РВИ в течение первых 3 лет позволило сократить количество смертей у детей на 700 в год с момента вакцинации [25]. В России Национальный календарь профилактических прививок (НКПП) иммунизацию детей от РВИ не предусматривает. Вакцинация проводится лишь в отдельных субъектах России в рамках региональных программ (календарей) иммунизации.

В мире лицензированы и успешно применяются две аттенуированные ротавирусные вакцины — пентавалентная реассортантная Ротатек («Merck Sharp & Dohme B.V.», Нидерланды) и моновалентная Ротарикс («GlaxoSmithKline Trading», Бельгия). На территории России в настоящее время зарегистрирована лишь одна вакцина — Ротатек. Она содержит 5 реассортантных вирусов: 4 несут на наружной оболочке поверхностные белки VP7 серотипов G1, G2, G3, G4 человеческих штаммов и VP4 серотипа P7 бычьего штамма, а 5-й — белок P1A от человеческого и белок G6 от бычьего родительских штаммов [29, 30]. Отечественная вакцина против РВИ отсутствует.

В 2014 г. была создана термостабильная оральная пентавалентная вакцина на основе бычьих ротавирусов в Индии. С 2018 г. она стала доступна на международном уровне как преквалифицированная ВОЗ вакцина. Данный иммунобиологический препарат был апробирован в Индии и показал высокую эффективность (66,7%) [30, 31].

В клинических исследованиях (I, II, III фазы) вакцины для профилактики РВИ пентавалентной живой (ВПЖ) («Serum Institute of India Ltd.», Индия) в Индии и Нигере приняли участие более 15 тыс. человек. Исследуемые популяции включали взрослых, детей младшего возраста и новорожденных. В ходе клинических исследований была доказана безопасность и хорошая переносимость ВПЖ во всех возрастных группах. Серьезные нежелательные явления не отмечались. Зарегистрировано несколько нежелательных явлений, которые были умеренными и преходящими. Выделения вируса в образцах стула не наблюдалось.

Проведенные клинические исследования показали наиболее высокую иммуногенность и профилактическую эффективность ВПЖ при иммунизации детей в возрасте 4–6 нед в режиме, предусматривающем введение 3 доз вакцины. Три дозы вакцины вводили в сочетании с вакцинами против

дифтерии, столбняка, коклюша, гемофильной инфекции, гепатита В и полиомиелита, что могло обеспечить быстрое расширение масштабов иммунизации с использованием ВПЖ, сокращение расходов и нагрузки, которая ложится на плечи семей в связи с посещением центров вакцинации.

С учетом вышеизложенного с целью государственной регистрации данного препарата в России было проведено проспективное рандомизированное двойное слепое плацебоконтролируемое клиническое исследование безопасности и эффективности ВПЖ на здоровых добровольцах в возрасте 18–45 лет в соответствии с Протоколом клинического исследования № РТВ 001/18 и получено разрешение МЗ РФ для проведения клинических исследований на детях (№ 46 от 29.01.2019 г.).

Целью настоящего исследования явилась оценка реактогенности, безопасности и иммунологической эффективности ВПЖ с участием детей. Исследование данной вакцины при иммунизации детей раннего возраста в России проведено нами впервые.

Материалы и методы

Реактогенность, безопасность и иммунологическая эффективность ВПЖ были изучены в многоцентровом проспективном рандомизированном двойном слепом плацебо-контролируемом клиническом исследовании с участием здоровых детей в возрасте 2 мес на момент первой вакцинации.

ВПЖ представляет собой стерильную лиофилизированную массу от розоватого до желтовато-белого цвета, рН 6,8–8,8. Для растворения лиофилизата используют цитратно-бикарбонатный буферный раствор, который предотвращает инактивацию лекарственной формы в кислой среде желудка. В состав цитратно-бикарбонатного буферного раствора входят бикарбонат натрия и кислоты лимонной моногидрат. Растворитель представляет собой прозрачную бесцветную жидкость. Растворение производят перед применением ВПЖ. Одна доза (2,5 мл) содержит живые реассортанты человеческого и бычьего ротавирусов, выращенные на культуре клеток Vero: ротавирусы типа G1, G2, G3, G4 и G9 не менее $10^{5.6}$ фокус флуоресцирующих единиц каждого. Все штаммы содержат ген VP7 соответствующего серотипа из штаммов человеческих вирусов, реассортантных с бычьим ротавирусом.

Бычьи и человеческие реассортантные штаммы серотипов G1, G2, G3, G4 и G9 предоставлены компанией «Serum Institute of India Ltd.» (Индия) доктором А.З. Капайкианом (Национальный институт здравоохранения, США). В «Serum Institute of India Ltd.» приготовили первичный банк вакцинных штаммов вируса, вторичный банк вакцинных штаммов вируса и рабочий банк вакцинных штаммов вируса для использования в производстве моно-

лентной нефасованной вакцины. В качестве стабилизатора в процессе производства готовой лекарственной формы использовали сахарозу и глицин, которые обеспечивают стабильность препарата в разных температурных режимах.

Клиническое исследование с участием детей проводилось в соответствии с этическими нормами и требованиями, регламентированными Хельсинкской декларацией (2013 г.), а также нормативными документами, регламентирующими проведение клинических исследований в России.

Исследование проводилось в двух клинических центрах: в Перми и Тюмени.

Критерии включения: здоровые дети мужского или женского пола в возрасте 2 мес на момент проведения первой вакцинации, не имеющие противопоказаний к иммунизации, гестационный возраст которых составил ≥ 37 нед, вес при рождении ≥ 2500 г, привитые согласно возрасту в соответствии с НКПП. Для включения в исследование родитель ребенка должен был собственноручно и добровольно подписать информированное согласие и выполнять требования протокола.

Критерии невключения:

- диарея или кровь в кале в анамнезе или нарушение режима дефекации за последние 14 дней;
- хронические заболевания желудочно-кишечного тракта, инвагинация кишечника и врожденные пороки развития желудочно-кишечного тракта, предрасполагающие к ней;
- операции на органах брюшной полости;
- аллергические реакции на компоненты вакцины или на любую предшествовавшую вакцинацию;
- сильные поствакцинальные реакции и осложнения, связанные с любой предыдущей вакцинацией;
- наличие какого-либо значительного системного нарушения со стороны легких, печени, почек, кожных покровов, сердечно-сосудистой системы, желудочно-кишечного тракта, эндокринной системы, иммунной системы, нервной системы, а также онкологическое или аутоиммунное заболевание;
- врожденные или генетические нарушения;
- острые инфекционные или неинфекционные заболевания на момент включения в исследование или если прошло менее 4 нед после выздоровления;
- наличие в анамнезе доказанного перенесенного гепатита В, дифтерии, столбняка, коклюша, полиомиелита, гемофильной или пневмококковой инфекции;
- подтвержденное либо подозреваемое иммунодефицитное состояние (наследственный или врожденный иммунодефицит);

- постоянное применение иммуносупрессоров или иммуномодуляторов, стероидных препаратов, иммуноглобулинов или компонентов крови.

Исследование состояло из 3 этапов. Первый этап состоял из периода скрининга, длительность которого могла достигать 7 дней, и периода последующего первичного динамического наблюдения за развитием ребенка после введения 1-й дозы ВПЖ длительностью 30 дней.

Второй этап включал 2-е введение ВПЖ с последующим вторичным динамическим наблюдением за развитием ребенка длительностью 45 дней.

Третий этап — 3-е введение ВПЖ с последующим третичным динамическим наблюдением за развитием ребенка, согласно общепринятым педиатрическим нормам, длительностью 30 дней. По данным клинических и лабораторных методов обследования в исследование были включены 100 детей с верифицированным диагнозом «здоров», соответствовавшие критериям включения и не имевшие критериев невключения.

Все дети-участники были рандомизированы в соотношении 1:1 в одну из групп: 1-я группа ($n = 50$) — дети, которые получали ВПЖ трехкратно перорально с интервалом не менее 4 нед в объеме 2,5 мл; 2-я группа ($n = 50$) — дети, которые получали плацебо трехкратно перорально с интервалом не менее 4 нед в объеме 2,5 мл.

Все дети — участники исследования получали другие профилактические прививки в соответствии с НКПП: против пневмококковой инфекции (в возрасте 2 мес — первая вакцинация, в возрасте 4,5 мес — вторая вакцинация), дифтерии, коклюша, столбняка, полиомиелита (в возрасте 3 мес — первая вакцинация, в возрасте 4,5 мес — вторая вакцинация). При этом допускалась одновременная вакцинация с введением ВПЖ/плацебо.

Реактогенность и безопасность ВПЖ оценивали по данным физикального осмотра, антропометрии, результатам измерений частоты сердечных сокращений, частоты дыхания, температуры тела, частоте возникновения поствакцинальных реакций и нежелательных явлений, а также по данным лабораторных исследований в ходе активного (визиты в поликлинику и телефонные звонки) и пассивного (дневники наблюдения, заполняемые родителями) наблюдения за участниками процесса.

После приема каждой дозы ВПЖ или плацебо все участники исследования наблюдались в исследовательском центре в течение 2 ч. Через 30 и 60 мин после приема дозы ВПЖ/плацебо врач-исследователь проводил физикальный осмотр и измерял основные жизненно важные показатели. Через 6 ч после каждой вакцинации врач-исследователь совершал телефонный звонок родителю ребенка.

Оценка выраженности поствакцинальных реакций проводилась по 4-балльной шкале по следующим критериям:

- реакция не выражена;
- слабая степень выраженности реакции — наличие слабовыраженных симптомов, гипертермия 37,0–37,5°C;
- средняя степень выраженности — симптомы, заметно нарушающие нормальную ежедневную деятельность, гипертермия 37,6–38,5°C;
- сильная реакция — симптомы, препятствующие нормальной ежедневной деятельности, гипертермия >38,6°C.

Лабораторные исследования включали определение показателей клинического (уровень гемоглобина, скорость оседания эритроцитов, форменные элементы, лейкоцитарная формула, тромбоциты, эритроциты) и биохимического (содержание аланин- и аспаратаминотрансферазы, γ -глутамил-трансферазы, билирубина общего, общего белка, мочевины, креатинина, С-реактивного белка, глюкозы) анализов крови, общего анализа мочи (содержание белка, глюкозы, клеточных элементов, солей, удельный вес, pH) и определение уровня общего IgE в сыворотках крови участников исследования.

Иммунологическую эффективность ВПЖ оценивали по величине титра антител (IgA) к ротавирусу в сыворотках крови детей до введения и после трехкратного введения исследуемого препарата. Изучение противоротавирусного IgA проводили в исследовательской лаборатории «Wellcome Trust» Христианского медицинского колледжа (Индия) методом иммуноферментного анализа в соответствии с утвержденной стандартной операционной процедурой «WTRL/ASA/035 «Определение антиротавирусного IgA методом ИФА с использованием 1% реагента для вестерн-блоттинга». Валидированная аналитическая процедура иммуноферментного анализа предназначена для количественной оценки антител IgA к ротавирусу в образцах сыворотки крови человека при анализе результатов клинических исследований ротавирусных вакцин.

В данном анализе использовали очищенные противовирусные IgG кролика в качестве иммобилизованных антител для связывания лизатов ротавируса. Связанный лизат ротавируса иммобилизует противоротавирусное антитело, присутствующее в испытательном образце. Противоротавирусное антитело IgA обнаруживается биотинилированным вторичным антителом к IgA. Определение амплифицировано предварительно сформированным комплексом авидин-биотинпероксидазы хрена. Концентрацию специфичного к ротавирусу IgA в тестовом образце определяли путем экстраполирования из стандартной кривой, которую составляли из нескольких разведений референтного стандарта

с известным количеством противоротавирусного IgA (в ЕД/мл).

В лаборатории было проведено изучение 197 проб сывороток крови детей раннего возраста, принявших участие в исследовании. Образцы хранились при -20°C до проведения тестирования.

Иммуногенность ВПЖ оценивали по следующим показателям:

- средняя геометрическая величина титра (СГТ) антител (IgA) у детей до вакцинации и не менее чем через 4 нед после 3-й вакцинации;
- уровень сероконверсии — количество и процент детей, у которых величина титра антител (IgA) не менее чем через 4 нед после 3-й вакцинации повысилась в 2–4 раза и более по сравнению с исходным уровнем;
- фактор сероконверсии — кратность прироста СГТ антител (IgA) не менее чем через 4 нед после 3-й вакцинации по сравнению с исходным уровнем.

Статистический анализ проводили с использованием методов параметрической и непараметрической статистики. Достоверность различий оценивали при помощи компьютерной программы «Statistica 6.0» с использованием *t*-распределения Стьюдента и критерия χ^2 . Уровень статистической значимости (вероятность получения ошибки) 95% расценивали как наличие статистически значимых различий между двумя явлениями (применяли однофакторный дисперсионный анализ). Для создания базы данных была применена программа MS Excel. При анализе полученных результатов определяли средние величины и стандартное отклонение.

Результаты

В ходе исследования зарегистрировано 55 поствакцинальных реакций у 25 участников.

Через 60 мин после приема 1, 2 и 3-й доз вакцины поствакцинальных реакций не зарегистрировано. По результатам телефонного звонка через 6 ч после 1-й иммунизации было зарегистрировано 7 поствакцинальных реакций у 2 участников исследования из 1-й группы в виде раздражительности, беспокойства, вздутия живота, снижения аппетита и повышения температуры тела до $37,6^{\circ}\text{C}$. Во 2-й группе поствакцинальных реакций в течение 6 ч не было.

Всего в течение 7 дней после 1-го введения препарата зарегистрировано 11 поствакцинальных реакций у 4 участников исследования из 1-й группы и 13 — у 5 участников исследования из 2-й группы. В дальнейшем в группе наблюдения после введения 2-й дозы препарата в течение 7 дней было зарегистрировано 10 реакций, после 3-й — 1. При этом в группе сравнения было зарегистрировано 1 и 7 реакций соответственно. Характеристика поствакцинальных реакций по степени выраженности на всех этапах исследования представлена в **табл. 1**.

Таким образом, в течение 7-дневного наблюдения после трехкратного введения препаратов зарегистрировано 43 поствакцинальных реакции. Они были слабыми или средними, за исключением одной сильной температурной реакции у ребенка из 2-й группы. Корректирующая терапия для снятия нежелательных симптомов использовалась только в 2 случаях: для купирования температурной реакции после 3-й иммунизации у ребенка из 2-й группы и купирования таких симптомов, как вздутие живота и кишечные колики, после 1-й иммунизации у ребенка

Таблица 1. Поствакцинальные реакции, зарегистрированные у участников исследования в течение первых 7 дней после введения препарата

Table 1. Postvaccinal reactions recorded in the trial participants during the first 7 days after the vaccination

Клинические проявления реакций Clinical manifestations of reactions	Степень выраженности Intensity	I этап исследования Phase I of the trial		II этап исследования Phase II of the trial		III этап исследования Phase III of the trial		Итого Total		χ^{2*}
		1-я группа 1 st group (n = 50)	2-я группа 2 nd group (n = 50)	1-я группа 1 st group (n = 49)	2-я группа 2 nd group (n = 49)	1-я группа 1 st group (n = 48)	2-я группа 2 nd group (n = 49)	1-я группа 1 st group (n = 50)	2-я группа 2 nd group (n = 50)	
Вздутие живота Bloating	Слабая Mild	1 (2%)	1 (2%)	1 (2,1%)	0	0	0	2 (4%)	1 (2%)	0,344
	Средняя Moderate	0	0	0	0	0	0			
	Сильная Severe	0	0	0	0	0	0			
Кишечные колики Bellyaches	Слабая Mild	0	1 (2%)	0	0	0	0	0	2 (4%)	2,041
	Средняя Moderate	0	1 (2%)	0	0	0	0			
	Сильная Severe	0	0	0	0	0	0			

Окончание табл. 1.
 End of Table 1.

Клинические проявления реакций Clinical manifestations of reactions	Степень выраженности Intensity	I этап исследования Phase I of the trial		II этап исследования Phase II of the trial		III этап исследования Phase III of the trial		Итого Total		χ^2 *
		1-я группа 1 st group (n = 50)	2-я группа 2 nd group (n = 50)	1-я группа 1 st group (n = 49)	2-я группа 2 nd group (n = 49)	1-я группа 1 st group (n = 48)	2-я группа 2 nd group (n = 49)	1-я группа 1 st group (n = 50)	2-я группа 2 nd group (n = 50)	
Диарея (жидкий стул) Diarrhea (loose stool)	Слабая Mild	1 (2%)	0	0	0	0	0	1 (2%)	0	1,010
	Средняя Moderate	0	0	0	0	0	0			
	Сильная Severe	0	0	0	0	0	0			
Повышение температуры тела Elevated body temperature	Слабая Mild	1 (2%)	0	1 (2,1%)	0	0	0	5 (10%)	3 (6%)	0,543
	Средняя Moderate	1 (2%)	1 (2%)	1 (2,1%)	0	1 (2,1%)	1 (2,1%)			
	Сильная Severe	0	0	0	0	0	1 (2,1%)			
Раздражительность Irritability	Слабая Mild	3 (6%)	1 (2%)	1 (2,1%)	0	0	1 (2,1%)	4 (8%)	3 (6%)	0,154
	Средняя Moderate	0	1 (2%)	0	0	0	0			
	Сильная Severe	0	0	0	0	0	0			
Беспокойство Restlessness	Слабая Mild	2 (4%)	1 (2%)	3 (6,2%)	0	0	1 (2,1%)	5 (10%)	3 (6%)	0,543
	Средняя Moderate	0	1 (2%)	0	0	0	0			
	Сильная Severe	0	0	0	0	0	0			
Снижение аппетита Decreased appetite	Слабая Mild	2 (4%)	3 (6%)	2 (4,1%)	0	0	1 (2,1%)	4 (8%)	4 (8%)	0,000
	Средняя Moderate	0	0	0	0	0	0			
	Сильная Severe	0	0	0	0	0	0			
Капризность Naughtiness	Слабая Mild	0	0	1 (2,1%)	0	0	0	1 (2%)	1 (2%)	0,000
	Средняя Moderate	0	0	0	0	0	1 (2,1%)			
	Сильная Severe	0	0	0	0	0	0			
Плач Crying	Слабая Mild	0	2 (4%)	0	0	0	0	0	2 (4%)	2,041
	Средняя Moderate	0	0	0	0	0	0			
	Сильная Severe	0	0	0	0	0	0			
Снижение уровня активности Decreased activity	Слабая Mild	0	0	0	1 (2,1%)	0	1 (2,1%)	0	2 (4%)	2,041
	Средняя Moderate	0	0	0	0	0	0			
	Сильная Severe	0	0	0	0	0	0			

Примечание. *Критическое значение критерия χ^2 Пирсона при уровне значимости $p = 0,05$ составляет 3,841.
Note. *The critical value of the Pearson chi-square (χ^2) is 3.841 at the significance level $p = 0.05$.

из 2-й группы. Все реакции были кратковременными (длительность от нескольких часов до 3 сут) и разрешились выздоровлением без последствий.

Статистически значимых различий в частоте зарегистрированных поствакцинальных реакций между группами не выявлено.

Обращает внимание, что возникновение кишечных колик, вялости и плача было отмечено только у детей из 2-й группы, что исключает связь с введением ВЖП. Кроме того, такие реакции, как повышение температуры тела, раздражительность, плач, снижение аппетита, диарея, как известно, характерны и для вакцин Превенар® 13 и Пентаксим®, которые участники исследования получали одновременно с исследуемым препаратом, согласно НКПП. Вероятно, поствакцинальные реакции, зарегистрированные в течение 7-дневного периода наблюдения после введения ВПЖ, могли быть обусловлены и сопутствующей вакцинацией.

Наряду с этими реакциями за весь период наблюдения за детьми было зарегистрировано 12 побочных проявлений после иммунизации в виде неблагоприятных симптомов, жалоб или интеркуррентных заболеваний, не связанных с иммунизацией, из которых 9 — у детей 1-й группы и 3 — среди детей из 2-й группы. При этом все они были слабой или средней степени тяжести, за исключением повышения температуры тела до 38,7°C у 1 ребенка из 2-й группы, которое было оценено как тяжелое. Статистически значимых различий в частоте развития и степени тяжести побочных проявлений после иммунизации между группами не выявлено.

Полученные результаты по безопасности ВПЖ сопоставимы с результатами клинических исследований вакцины Ротатек, которая зарегистрирована и успешно используется в России. При изучении безопасности вакцины Ротатек нежелательные реакции регистрировались в течение 42 дней после вакцинации. Наиболее частыми нежелательными явлениями также явились инфекции верхнего дыхательного тракта, диарея, рвота, острый средний отит, кашель и раздражительность [29].

По данным зарубежной литературы, использование ротавирусной вакцины нередко ассоциировалось с повышенной частотой возникновения инвагинации кишечника, необычной формы непроходимости кишечника [32, 33]. В ходе проведения нашего клинического исследования поствакцинальных осложнений, включая инвагинацию кишечника, а также серьезных нежелательных явлений не зарегистрировано.

Анализ влияния введения вакцины на показатели клинического и биохимического анализов крови, общего анализа мочи показал, что лабораторные показатели, регистрируемые в динамике наблюдения, колебались в пределах физиологической нор-

мы, существенного отклонения от фоновых значений не отмечено.

Аллергизирующих свойств у ВПЖ не выявлено — показатели сывороточного IgE не претерпевали значительных изменений в динамике наблюдения.

Отрицательной динамики в состоянии здоровья детей, привитых как ВПЖ, так и плацебо, не выявлено. Дети развивались гармонично, в соответствии с возрастом. Результаты проведенных лабораторных исследований подтвердили, что введение ВПЖ не оказывает негативного влияния на основные показатели клинического и биохимического анализов крови и показатели общего анализа мочи.

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют об удовлетворительном профиле безопасности ВПЖ при трехкратной иммунизации детей. Полученные результаты были сопоставимы с данными зарубежных и отечественных авторов [30, 32].

Оценка иммунологической эффективности ВПЖ показала, что доля детей — участников клинического исследования, которые были серопозитивными с концентрацией ротавирусспецифического IgA ≥ 20 Ед/мл на момент их включения в исследование перед приемом 1-й дозы, составила 20,8% в группе наблюдения и 32,7% в группе сравнения, что подтверждает данные литературы о возможной серопозитивности младенцев, причиной которой могут быть высокий уровень воздействия природной ротавирусной инфекции в очень раннем возрасте (ранее полученные результаты клинических исследований изучаемой вакцины в Индии и Нигере), трансплацентарная передача материнских антител ребенку, а также алиментарный путь передачи материнских антител через грудное молоко [34].

Проведение трехкратной вакцинации серопозитивных детей позволило достичь показателя сероконверсии 50%. В группе исходно серонегативных участников 92,1% привитых ВПЖ имели четырехкратное и более увеличение титра специфических антител. Увеличение количества специфических антител IgA после трехкратного введения ВПЖ в 1-й группе статистически значимо отличалось от кратности увеличения уровня IgA в группе плацебо ($t = 2,020$; $p = 0,047$).

Результаты оценки иммунологической эффективности ВПЖ в популяции серонегативных и серопозитивных детей — участников исследования представлены в **табл. 2**.

Обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют о высоких иммуногенных свойствах ВПЖ и являются доказательством того, что сероконверсия при трехкратной иммунизации может происходить даже у исходно серопозитивных лиц, что подтверждает

Таблица 2. Иммунологическая эффективность ВПЖ
Table 2. Immunological efficacy of BRV-PV

Группа Group	СГТ антител, Ед/мл GMC of antibodies, U/ml			Кратность нарастания титров антител Antibody titer ratio	Количество лиц с не менее чем 2-кратной сероконверсией Number of individuals with ≥ 2 seroconversions		Количество лиц с не менее чем 3-кратной сероконверсией Number of individuals with ≥ 3 seroconversions		Количество лиц с не менее чем 4-кратной сероконверсией Number of individuals with ≥ 4 seroconversions	
	до вакцинации before vaccination	после трехкратной вакцинации after three-dose vaccination	t (p -value)		абс. abs (n)	% [95% ДИ] % [95% CI]	абс. abs (n)	% [95% ДИ] % [95% CI]	абс. abs (n)	% [95% ДИ] % [95% CI]
	СГТ [95% ДИ] GMC [95% CI]									
1 ($n = 48$)	3,4 [1,64–6,87]	130,8 [79,3–215,6]	2,819 (0,007)*	39,05	40	83,3 [70,4–91,3]	39	81,3 [68,1–89,8]	38	79,2 [65,7–88,3]
2 ($n = 49$)	5,9 [2,7–11,2]	16,6 [8,2–32,0]	0,556 (0,581)	2,80	22	44,9 [31,9–58,7]	19	38,8 [26,4–52,8]	17	34,7 [22,9–48,7]
t (p -value)	0,385 (0,701)	3,499 (0,0007)*	–	2,493 (0,014)*	χ^2	15,531*		18,196*		19,534*

Примечание. *Статистически значимые различия.
Note. *Statistically significant differences.

ранее полученные результаты клинических исследований и позволяет предполагать высокую потенциальную эффективность препарата [35].

Таким образом, проведенные исследования позволяют заключить, что ВПЖ характеризуется удовлетворительным профилем безопасности, высокой иммуногенностью при трехкратной иммунизации детей и может быть рекомендована к регистрации для иммунизации детей с 2-месячного возраста. Вопрос о локализации производства вакцин против РВИ на отечественных предприятиях в условиях сопоставимости двух зарегистрированных вакцин по показателям безопасности и иммуногенности может быть решен на основе результатов фармакоэкономического анализа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Das J.K., Salam R.A., Bhutta Z.A. Global burden of childhood diarrhea and interventions. *Curr. Opin. Infect Dis.* 2014; 27(5): 451-458.
2. Saha S.K., Arifeen Sh., Schrag S.J. Aetiology of neonatal infection in South Asia (ANISA): an initiative to identify appropriate program priorities to save newborns. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2016; 35(5): S6-S8.
3. Таточенко В.К., Озерецковский Н.А., Федоров А.М. *Иммунопрофилактика-2014: (Справочник)*. М.: ПедиатрЪ; 2014: 153-8.
4. Вакцинопрофилактика ротавирусной инфекции у детей: Клинические рекомендации. М.; 2017.
5. Резолюция заседания Экспертного совета по ротавирусной инфекции и современным возможностям вакцинопрофилактики. *Вопросы современной педиатрии*. 2019; 18(4): 305-8.
6. Fischer T.K., Bresee J.S., Glass R.I. Rotavirus vaccines and the prevention of hospital-acquired diarrhea in children. *Vaccine*. 2004; 22(Suppl. 1): S49-54.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.08.017>
7. Dormitzer P.R. Rotaviruses. In: Bennett J., Dolin R., Blaser M.J., eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice*

of Infectious Diseases. London: Churchill Livingstone; 2004: 1902-13.

8. Offit P.A. Rotaviruses. In: Bennett J., Dolin R., Blaser M.J., eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. London: Churchill Livingstone; 2000: 1696-703.
9. Послова Л.Ю., Ковалишена О.В., Чубукова О.А., Сергеева А.В. Клинико-эпидемиологическая характеристика ротавирусной инфекции в детском многопрофильном стационаре. *Медицинский альманах*. 2015; (5): 60-5.
10. Bruun T., Salamanca B.V., Bekkevold T. et al. Burden of rotavirus disease in Norway: using national registries for public health research. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2016; 35(4): 396-400.
11. Ozkaya-Parlakay A., Tezer H. Burden of rotavirus in hospitalized children in Turkey. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2014; 33(9): 992-993.
12. Pijnacker R.M., Mughini-Gras L., Vennema H. et al. Marked decrease in rotavirus detections among preschool children unvaccinated for rotavirus in the Netherlands, 2014. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2016; 35(7): 809-811.
13. Redondo-González O., Tenías-Burillo J.M. A multifactorial regression analysis of the features of community-acquired rotavirus requiring hospitalization in Spain as represented in the Minimum Basic Data Set. *Epidemiol. Infect.* 2016; 144(12): 2509-16.
14. Health Epidemiology Reference Group of the World Health Organization and UNICEF Global causes of diarrheal disease mortality in children younger 5 years of age: a systematic review. *PLoS One*. 2013; 8(9): e72788.
15. Goto T., Tsugawa Y., Mansbach J.M. et al. Trends in infectious disease hospitalizations in US children, 2000 to 2012. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2016; 35(9): e158-e163.
16. Iturriza-Gómara M., Dallman T., Bányai K., et al. Rotavirus surveillance in Europe, 2005-2008: web-enabled reporting and real-time analysis of genotyping and epidemiological data. *J. Infect. Dis.* 2009; (1): 215-221.
17. Estimated rotavirus deaths for children under 5 years of age. Available at: http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/estimates/rotavirus/en.
18. ВОЗ. Неинфекционные заболевания. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/ru/>
19. Clark A., Black R., Tate J., Roose A., Kotloff K., Lam D., et al. Estimating global, regional and national rotavirus deaths in children aged <5 years: current approaches, new analyses and

- proposed improvements. *PLoS One*. 2017; 12(9): e0183392. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0183392>
20. Институт по измерению показателей здоровья и оценке состояния здоровья, Сеть человеческого развития, Всемирный банк. *Глобальное бремя болезней: Порождение доказательств, направление политики. Региональное издание для Европы и Центральной Азии*. Спб: ИМБЕ; 2013.
 21. ВОЗ. Всемирный доклад о старении и здоровье. 2016. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/186463/10/9789244565049_rus.pdf
 22. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году: Государственный доклад. М.; 2017.
 23. Лобзин Ю.В. Клинические рекомендации (протокол лечения) оказания медицинской помощи детям больным ротавирусной инфекцией. М.; 2015.
 24. Озерецковский Н.А. Календарь профилактических прививок США на 2014 год. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2014; (1): 80.
 25. Фельдблюм И.В., Алыева М.Х. Вакцинопрофилактика сегодня: достижения, проблемы, пути совершенствования. В кн.: *Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Перспективы развития производства и применения иммунобиологических препаратов в XXI веке»*. Пермь; 2018: 24-30.
 26. Брико Н.И., Фельдблюм И.В. Современная концепция развития вакцинопрофилактики в России. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2019; 18(5): 4-13. DOI: <http://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-5-4-1>
 27. Patel M.M., Steele D., Gentsch J.R. et al. Real-world impact of rotavirus vaccination. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2011; 30(1 Suppl): S1-S5.
 28. Rotavirus vaccines: WHO position paper – January 2013. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2013; 88(5): 49-64.
 29. Гречуха Т.А., Новикова Д.А., Ткаченко Н.Е., Намазова-Баранова Л.С. Современный взгляд на возможность профилактики ротавирусной инфекции. *Детские инфекции*. 2014; 13(4): 30-2.
 30. Намазова-Баранова Л.С., Федосенко М.В., Вишнёва Е.А., Таточенко В.К., Селимзянова Л.Р., Чемакина Д.С. Вакцинация против ротавирусной инфекции: 10-летний мировой опыт успешного применения. *Вопросы современной педиатрии*. 2017; 16(4): 273-85. DOI: <http://doi.org/10.15690/vsp.v16i4.1773>
 31. Шевцов В.А., Евреина Е.Э., Индикова И.Н., Хантиминова Л.М., Горенков Д.В., Рукавишников А.В. Эффективность и безопасность вакцин для профилактики ротавирусной инфекции. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019; 19(4): 215-24. DOI: <http://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-4-215-224>
 32. Santosham M., Steele D. Rotavirus vaccines – a new hope. *N. Engl. J. Med.* 2017; 376(12): 1170-2. DOI: <http://doi.org/10.1056/NEJMe1701347>
 33. Руженцова Т.А., Плоскирева А.А., Горелов А.В. Осложнения ротавирусной инфекции у детей. *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского*. 2016; 95(2): 38-43.
 34. Tate J.E., Parashar U.D. Approaches to monitoring intussusception following rotavirus vaccination. *Expert. Opin. Drug Saf.* 2019; 18(1): 21-7. DOI: <http://doi.org/10.1080/14740338.2019.1561857>
 35. Groome M.J., Fairlie L., Morrison J., Fix A., Koen A., Maseña M., et al. Safety and immunogenicity of a parenteral trivalent P2-VP8 subunit rotavirus vaccine: a multisite, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Infect. Dis.* 2020; 20(7): 851-63. DOI: [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30001-3](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30001-3)
- ## REFERENCES
1. Das J.K., Salam R.A., Bhutta Z.A. Global burden of childhood diarrhea and interventions. *Curr. Opin. Infect Dis.* 2014; 27(5): 451-458.
 2. Saha S.K., Arifeen Sh., Schrag S.J. Aetiology of neonatal infection in South Asia (ANISA): an initiative to identify appropriate program priorities to save newborns. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2016; 35(5): S6-S8.
 3. Tatchenko V.K., Ozeretskovskiy N.A., Fedorov A.M. *Immunoprophylaxis-2014: (Guide) [Immunoprofilaktika-2014: (Spravochnik)]*. Moscow: Pediatr; 2014: 153-8. (in Russian)
 4. Vaccination of rotavirus infection in children: Clinical recommendations. Moscow; 2017.
 5. Resolution of the meeting of the Expert Council on rotavirus infection and modern possibilities of vaccination. *Voprosy sovremennoy pediatrii*. 2019; 18(4): 305-8. (in Russian)
 6. Fischer T.K., Bresee J.S., Glass R.I. Rotavirus vaccines and the prevention of hospital-acquired diarrhea in children. *Vaccine*. 2004; 22(Suppl. 1): S49-54. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.08.017>
 7. Dormitzer P.R. Rotaviruses. In: Bennett J., Dolin R., Blaser M.J., eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. London: Churchill Livingstone; 2004: 1902-13.
 8. Offit P.A. Rotaviruses. In: Bennett J., Dolin R., Blaser M.J., eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. London: Churchill Livingstone; 2000: 1696-703.
 9. Poslova L.Yu., Kovalishena O.V., Chubukova O.A., Sergeeva A.V. Clinical and epidemiological characteristics of rotavirus infection in children multipurpose day-and-night clinic. *Meditsinskiy al'manakh*. 2015; (5): 60-5. (in Russian)
 10. Bruun T., Salama B.V., Bekkevold T. et al. Burden of rotavirus disease in Norway: using national registries for public health research. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2016; 35(4): 396-400.
 11. Ozkaya-Parlakay A., Tezer H. Burden of rotavirus in hospitalized children in Turkey. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2014; 33(9): 992-993.
 12. Pijnacker R.M., Mughini-Gras L., Vennema H. et al. Marked decrease in rotavirus detections among preschool children unvaccinated for rotavirus in the Netherlands, 2014. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2016; 35(7): 809-811.
 13. Redondo-González O., Tenías-Burillo J.M. A multifactorial regression analysis of the features of community-acquired rotavirus requiring hospitalization in Spain as represented in the Minimum Basic Data Set. *Epidemiol. Infect.* 2016; 144(12): 2509-16.
 14. Health Epidemiology Reference Group of the World Health Organization and UNICEF Global causes of diarrheal disease mortality in children younger 5 years of age: a systematic review. *PLoS One*. 2013; 8(9): e72788.
 15. Goto T., Tsugawa Y., Mansbach J.M. et al. Trends in infectious disease hospitalizations in US children, 2000 to 2012. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2016; 35(9): e158-e163.
 16. Iturriza-Gómara M., Dallman T., Bányai K., et al. Rotavirus surveillance in Europe, 2005-2008: web-enabled reporting and real-time analysis of genotyping and epidemiological data. *J. Infect. Dis.* 2009; (1): 215-221.
 17. Estimated rotavirus deaths for children under 5 years of age. Available at: http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/estimates/rotavirus/en.
 18. WHO. Noncommunicable diseases. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>
 19. Clark A., Black R., Tate J., Roose A., Kotloff K., Lam D., et al. Estimating global, regional and national rotavirus deaths in children aged <5 years: current approaches, new analyses and

- proposed improvements. *PloS One*. 2017; 12(9): e0183392. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0183392>
20. Institute for Health Metrics and Evaluation, Human Development Network, The World Bank. *The Global Burden of Disease: Generating Evidence, Guiding Policy*. Seattle, WA: IHME; 2013.
 21. On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2018: State report. Moscow; 2017. (in Russian)
 22. Lobzin Yu.V. Clinical recommendations (treatment protocol) for providing medical care to children with rotavirus infection. Moscow; 2015. (in Russian)
 23. Ozeretskovskiy N.A. US preventive vaccination calendar for 2014. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2014; (1): 80. (in Russian)
 24. Fel'dblyum I.V., Alyeva M.Kh. Vaccination today: achievements, problems, ways to improve. In: *Proceedings of the All-Russian Scientific and Practical Conference «Prospects for the Development of Production and Use of Immunobiological Drugs in the XXI Century» [Materialy Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Perspektivy razvitiya proizvodstva i primeneniya immunobiologicheskikh preparatov v XXI veke»]*. Perm'; 2018: 24-30. (in Russian)
 25. Briko N.I., Fel'dblyum I.V. The modern concept of development of vaccine prevention in Russia. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2019; 18(5): 4-13. DOI: <http://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-5-4-13> (in Russian)
 26. Patel M.M., Steele D., Gentsch J.R. et al. Real-world impact of rotavirus vaccination. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2011; 30(1 Suppl): S1-S5.
 27. Rotavirus vaccines: WHO position paper – January 2013. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2013; 88(5): 49-64.
 28. Grechukha T.A., Novikova D.A., Tkachenko N.E., Namazova-Baranova L.S. The prevention of rotavirus infection: the modern view of the possibility. *Detskie infektsii*. 2014; 13(4): 30-2. (in Russian)
 29. Namazova-Baranova L.S., Fedoseenko M.V., Vishneva E.A., Tatchenko V.K., Selimzyanova L.R., Chemakina D.S. Vaccination against rotavirus infection: 10-year global experience of successful use. *Voprosy sovremennoy pediatrii*. 2017; 16(4): 273-85. DOI: <http://doi.org/10.15690/vsp.v16i4.1773> (in Russian)
 30. Shevtsov V.A., Evreinova E.E., Indikova I.N., Khantimirova L.M., Gorenkov D.V., Rukavishnikov A.V. Vaccine safety and efficacy in preventing rotavirus infection. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie*. 2019; 19(4): 215-24. DOI: <http://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-4-215-224> (in Russian)
 31. Santosham M., Steele D. Rotavirus vaccines – a new hope. *N. Engl. J. Med.* 2017; 376(12): 1170-2. DOI: <http://doi.org/10.1056/NEJMe1701347>
 32. Ruzhentsova T.A., Ploskireva A.A., Gorelov A.V. Complications of rotavirus infection in children. *Pediatriya. Zhurnal im. G.N. Speranskogo*. 2016; 95(2): 38-43. (in Russian)
 33. Tate J.E., Parashar U.D. Approaches to monitoring intussusception following rotavirus vaccination. *Expert. Opin. Drug Saf.* 2019; 18(1): 21-7. DOI: <http://doi.org/10.1080/14740338.2019.1561857>
 34. Groome M.J., Fairlie L., Morrison J., Fix A., Koen A., Masenya M., et al. Safety and immunogenicity of a parenteral trivalent P2-VP8 subunit rotavirus vaccine: a multisite, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Infect. Dis.* 2020; 20(7): 851-63. DOI: [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30001-3](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30001-3)

Информация об авторах:

Фельдблум Ирина Викторовна[✉] — д.м.н., проф., зав. каф. эпидемиологии и гигиены ФГБОУ ВО ПГМУ им. акад. Е.А. Вагнера, 614990, Пермь, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4398-5703>. E-mail: irinablum@mail.ru

Субботина Ксения Андреевна — к.м.н., доц. каф. эпидемиологии и гигиены ФГБОУ ВО ПГМУ им. акад. Е.А. Вагнера, 614990, Пермь, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0060-6251>. E-mail: ka.subbotina@bk.ru

Рычкова Ольга Александровна — д.м.н., доц., зав. каф. детских болезней лечебного факультета с курсом иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО ТГМУ, 625023, Тюмень, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9468-6562>.

Миронов Александр Николаевич — д.м.н., медицинский директор ООО «Национальное Агентство Лекарственных Средств», 119192, Москва, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2969-2402>.

Волкова Дарья Александровна — аспирант каф. эпидемиологии и гигиены ФГБОУ ВО ПГМУ им. акад. Е.А. Вагнера, 614990, Пермь, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7388-9950>.

Метов Азамат Олегович — генеральный директор ООО «ФАРМ ЭЙД ЛТД», 109004, Москва, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0794-0524>.

Сакаева Ирина Вячеславовна — зам. генерального директора ООО «Национальное Агентство Лекарственных Средств», 119192, Москва, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4662-4105>.

Купина Наталья Викторовна — к.м.н., генеральный директор ООО «СиТиЭрФарма», 119311, Москва, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5696-9919>.

Information about the authors:

Irina V. Feldblum[✉] — Dr. Sci. (Med.), Prof., Head, Department of epidemiology and hygiene, Perm State Medical University named after Academician E.A. Wagner, 614990, Perm, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4398-5703>. E-mail: irinablum@mail.ru

Ksenya A. Subbotina — PhD (Med.), Assoc. Prof., Department of epidemiology and hygiene, Perm State Medical University named after Academician E.A. Wagner, 614990, Perm, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0060-6251>. E-mail: ka.subbotina@bk.ru

Olga A. Rychkova — Dr. Sci. (Med), Head, Department of children's diseases, Faculty of medicine with a course of immunology and allergology, Tyumen State Medical University, 625023, Tyumen, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9468-6562>.

Aleksander N. Mironov — Dr. Sci. (Med.), Medical director, National Agency of Medicines Ltd., 119192, Moscow, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2969-2402>.

Daria A. Volkova — graduate student, Department of epidemiology and hygiene, Perm State Medical University named after Academician E.A. Wagner, 614990, Perm, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7388-9950>.

Azamat O. Metov — general director, PHARM AID LTD, 109004, Moscow, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0794-0524>.

Irina V. Sakaeva — deputy general director, National Agency of Medicines Ltd., 119192, Moscow, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4662-4105>.

Natalia V. Kupina — PhD (Med.), general director, CTR-Pharma Ltd., 119311, Moscow, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5696-9919>.

Карбышев Михаил Сергеевич — рук. направления трансфера технологий и научных исследований ООО «ФАРМ ЭЙД ЛТД», 109004, Москва, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5969-3874>.

Миронов Никита Александрович — проектный менеджер доклинических и клинических исследований Департамента доклинических и клинических исследований ООО «Национальное Агентство Лекарственных Средств», 119192, Москва, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6729-4371>.

Кондратьева Ярослава Юрьевна — директор по качеству ООО «СиТиЭрФарма», 119311, Москва, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8943-5374>.

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

Mikhail S. Karbyshev — Head, Technology transfer and scientific research, PHARM AID LTD, 119311, Moscow, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5969-3874>.

Nikita A. Mironov — project manager of preclinic and clinic researches, Department of preclinic and clinic researches, National Agency of Medicines Ltd., 119192, Moscow, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6729-4371>

Yaroslava Yu. Kondratyeva — quality director, CTR-Pharma Ltd., 119311, Moscow, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8943-5374>.

Contribution: the authors contributed equally to this article.



Современные практики иммунизации детей, экспонированных ВИЧ и ВИЧ-инфицированных

Кукаркина В.А.^{1,2}, Голубкова А.А.³, Подымова А.С.¹

¹ГБУЗ Свердловской области «Областной центр профилактики и борьбы со СПИД», 620102, Екатеринбург, Россия;

²ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет», 620014, Екатеринбург, Россия;

³ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, Москва, Россия

Цель исследования — на основании изучения современных практик вакцинопрофилактики в рамках Национального календаря профилактических прививок (НКПП) скорректировать тактику иммунизации детей, экспонированных ВИЧ и ВИЧ-инфицированных.

Материалы и методы. По информации в амбулаторной карте пациента, карте профилактических прививок и истории развития ребенка проведен анализ полноты и своевременности иммунизации 216 детей, экспонированных ВИЧ, и 198 ВИЧ-инфицированных детей. Контрольную группу составили 100 детей, рожденных от матерей с отрицательным ВИЧ-статусом. Для изучения приверженности прививкам был проведен опрос 160 родителей детей, состоявших на диспансерном учете по ВИЧ-инфекции.

Результаты. Установлено, что, несмотря на отсроченное проведение прививок, охват детей вакцинацией против основных инфекций НКПП составлял 94,4–97,5%. Наибольшие трудности в реализации НКПП возникали при иммунизации детей до 2 лет. «Упущенные возможности» при иммунизации в дальнейшем привели к нарушению календарных сроков прививок и проведению их в более старшем возрасте. Число «пропущенных прививок» в исследуемой когорте не превышало критерии, рекомендованные ВОЗ (10%) и составляло по отдельным видам прививок (АКДС и полиовакцина) 5,8%.

Доля детей, вакцинированных против туберкулеза в родильном доме, в группе ВИЧ-экспонированных была в 2 раза меньше, чем в контрольной, однако различий в частоте формирования вакцинальной аллергии в группах не выявлено.

В процессе вакцинации детей с ВИЧ-инфекцией на фоне высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ) количество CD4-лимфоцитов соответствовало параметрам возрастной нормы. По сравнению с исходными данными изменений в иммунном статусе привитых не зарегистрировано.

Организационными упущениями при иммунизации детей с ВИЧ-инфекцией были использование живой полиовакцины, 3-кратная схема прививок против вирусного гепатита В у детей из групп риска, а также вакцинация против туберкулеза при отсутствии трехэтапной химиопрофилактики передачи ВИЧ от матери ребенку.

При оценке приверженности прививкам родителей установлено, что 85% респондентов считали вакцинацию необходимой для профилактики инфекционных заболеваний, 11,3% затруднились с ответом в связи с возможным риском вакцинальных реакций и отсутствием гарантированной защиты и 3,8% были против вакцинации, ссылаясь на собственное мнение. Наиболее авторитетным источником информации для большинства респондентов — как положительно настроенных по отношению к вакцинации, так и сомневающих в ее необходимости — были медицинские работники (98,5 и 72,2% соответственно). У 33,3% негативно относящихся к прививкам источником информации также были медицинские работники.

Заключение. Проведенный анализ полноты и своевременности вакцинации в когорте ВИЧ-инфицированных и экспонированных ВИЧ детей позволил выявить наиболее проблемные вопросы, касающиеся проведения прививок в сроки, регламентированные НКПП. Дети с ВИЧ-инфекцией, имеющие 1-ю категорию иммунных нарушений на фоне ВААРТ, подлежат вакцинации в рамках НКПП в полном объеме.

Использование комбинированных вакцин позволит снизить в этой когорте манипуляционную нагрузку, преодолеть выявленные несоответствия и оптимизировать НКПП.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция; дети; проблемы вакцинации; приверженность прививкам.

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: Кукаркина В.А., Голубкова А.А., Подымова А.С. Современные практики иммунизации детей, экспонированных ВИЧ и ВИЧ-инфицированных. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(4): 375–384.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-10>

Modern practices of immunizing children exposed to HIV and HIV-infected

Vera A. Kukarkina^{1,2*}, Alla A. Golubkova³, Anzhelika S. Podymova¹

¹Regional Center for the Prevention and Control of AIDS, 620102, Yekaterinburg, Russia;

²Ural State Medical University, 620014, Yekaterinburg, Russia;

³Central Research Institute for Epidemiology, 111123, Moscow, Russia

The purpose of the study is to adjust the tactics of immunization of children exposed to HIV and HIV-infected people on the basis of studying modern vaccination practices within the framework of the National Calendar of Preventive Vaccinations (NCPV).

Materials and methods. According to the information in the patient's outpatient card, the card of preventive vaccinations and the history of the child's development, the completeness and timeliness of immunization of 216 children exposed to HIV and 198 HIV-infected children were analyzed. The control group consisted of 100 children born to mothers with negative HIV status. In order to study adherence to vaccines, a survey was conducted among 160 parents of children registered in the dispensary for HIV infection.

Results. It was established that, despite the delayed immunization, the coverage of vaccination against the major infections from NCPV among children ranged from 94.4% to 97.5%. The greatest difficulties in the implementation of the NCPV arose when immunizing children under 2 years of age. The "missed opportunities" during immunization subsequently led to a violation of the calendar terms of vaccinations and their implementation at an older age. The number of "missed vaccinations" in the study cohort did not exceed the criteria recommended by WHO (10%) and amounted to 5.8% for certain types of vaccines (DTP and polio).

The proportion of children vaccinated against tuberculosis in the maternity hospital in the HIV-exposed group was 2 times less compared to the control group, however, there were no differences in the incidence of vaccine induced allergy.

During the vaccination of children with HIV on the highly active antiretroviral therapy (HAART), the number of CD4 lymphocytes corresponded to the parameters of the age norm. Compared to baseline data, no changes in the immune status of vaccinees were recorded.

Organizational omissions in immunizing children with HIV infection were the use of live polio vaccine, a 3-dose vaccination schedule against viral hepatitis B in children at risk, and vaccination against tuberculosis in the absence of a three-stage chemoprevention of mother-to-child transmission of HIV.

When assessing parental vaccine adherence, it was found that 85% of respondents considered vaccination necessary for the prevention of infectious diseases, 11.3% found it difficult to answer, due to the possible risk of vaccine reactions and the lack of guaranteed protection, and 3.8% were against vaccination, citing own opinion. The most authoritative source of information for most respondents, both positive for vaccination and those who doubted its need, was medical workers (98.5 and 72.7%, respectively). In 33.3% of those who are negatively related to vaccines, health workers were also a source of information.

Conclusion. The analysis of the completeness and timeliness of vaccinations in a cohort of HIV-infected and exposed to HIV revealed the most problematic issues regarding vaccinations within the time periods regulated by the NCPV. Children with HIV infection who have the 1st category of immune disorders on the background of HAART are subject to vaccination in the framework of the National calendar of vaccinations to full extent. The use of combined vaccines will make it possible to reduce the manipulation load in this cohort, overcome the identified inconsistencies and optimize the vaccination calendar.

Keywords: HIV infection; children; vaccination problems; vaccination commitment.

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: Kukarkina V.A., Golubkova A.A., Podymova A.S. [Modern practices of immunizing children exposed to HIV and HIV-infected]. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(4): 375–384. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-10>

Received 20 April 2020

Accepted 31 May 2020

Введение

Среди известных человечеству технологий управления эпидемическим процессом при инфекциях с различными механизмами передачи вакцина-профилактика считается наиболее эффективным и рентабельным мероприятием. Ее результаты на протяжении всей истории применения вакцин, начиная

от Э. Дженнера до наших дней, настолько очевидны, что лишают аргументов любых оппонентов [1].

При всей эффективности санитарных мер, улучшении водоснабжения, появлении новых лекарственных препаратов и технологий лечения не удалось получить таких результатов, как от массовой вакцинации [2, 3]. Эпидемиологический кон-

троль над инфекциями с помощью вакцинопрофилактики и снижение, а порой даже отсутствие заболеваемости на достаточно продолжительном отрезке привели к отрицанию необходимости проводить прививки, особенно иммунокомпрометированным контингентам и лицам с хронической соматической патологией, тогда как именно они нуждаются в гарантированной защите от инфекции. К контингентам с высоким риском инфицирования и высокой вероятностью неблагоприятных исходов заболевания относятся дети, рожденные от ВИЧ-инфицированных родителей: экспонированные ВИЧ (ЭВИЧ) и ВИЧ-инфицированные (ИВИЧ) [4]. С другой стороны, введение им иммунобиологических препаратов, содержащих живые, хотя и аттенуированные антигены, требует взвешенного подхода к определению тактики иммунизации [5, 6].

В настоящее время накоплен определенный опыт иммунизации ИВИЧ-детей и взрослых против ряда инфекционных заболеваний, хотя единой стратегии вакцинации не существует. Большинство специалистов подтверждают полную безопасность для ИВИЧ-людей введения инактивированных вакцин и анатоксинов [7]. В отношении прививок живыми вакцинами единой точки зрения не существует, однако поиск компромиссов неизбежен. Первоначальная практика отказа от использования у ИВИЧ-людей живых аттенуированных вакцин в последние годы была пересмотрена и скорректирована с учетом эпидситуации в каждой отдельно взятой стране [8].

Наиболее значимые коррективы в календарь прививок внесла ситуация по туберкулезу¹. Первоначальные рекомендации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) 1987 г. об обязательных прививках детей от ИВИЧ-родителей в 2007 г. были отменены в связи с регистрацией у вакцинированных диссеминированной БЦЖ-инфекции, и только в 2018 г. были окончательно определены условия, при которых вакцинация БЦЖ стала возможной и максимально безопасной [9, 10].

В Свердловской области накоплен региональный опыт иммунизации ЭВИЧ- и ИВИЧ-детей от ИВИЧ-родителей в рамках Национального календаря профилактических прививок (НКПП), однако вопросы полноты, своевременности их проведения и факторы, влияющие на приверженность прививкам родителей, ранее не изучались [2].

Цель настоящего исследования — на основании изучения современных практик вакцинопрофилактики в рамках существующего НКПП скорректировать тактику иммунизации ЭВИЧ- и ИВИЧ-детей.

¹ Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 21.03.2014 №125-н «О национальном календаре профилактических прививок и календаре профилактических прививок по эпидемическим показаниям».

Материалы и методы

В проспективном когортном исследовании проведен анализ полноты и своевременности вакцинации 198 детей с ВИЧ-инфекцией и 216 детей с перинатальным контактом по ВИЧ с нереализованной трансмиссией вируса, состоявших на диспансерном учете в клинко-диагностическом отделении ГБУЗ СО «ОЦ СПИД».

Критериями включения в исследование были диспансерное наблюдение в клинко-диагностическом отделении, проживание на территории Екатеринбурга и вертикальный путь инфицирования. *Критерии исключения* — проживание за пределами Екатеринбурга и иные пути заражения.

На момент исследования средний возраст ЭВИЧ-детей составлял $3,9 \pm 2,7$ года (95% доверительный интервал (ДИ) 1,4–9,1), ИВИЧ-детей — $11,0 \pm 4,4$ года (95% ДИ 2,4–19,6).

В группе ЭВИЧ-детей оценивали величину вакцинального рубца и размер папулы при проведении пробы Манту. Вакцинальный рубец считали достаточным при его размере более 4 мм. Пробу Манту оценивали как нормергическую при величине папулы 5–16 мм.

Контрольную группу составили 100 детей, рожденных в родильных домах г. Екатеринбурга от матерей с отрицательным ВИЧ-статусом. Средний возраст детей в контрольной группе составлял $2,4 \pm 0,3$ года (95% ДИ 1,8–2,9).

Для оценки иммунного статуса ИВИЧ-детей определяли количество CD4-лимфоцитов в момент постановки клинического диагноза и далее в процессе наблюдения. При оценке иммунных нарушений в соответствующих возрастных группах руководствовались клиническими рекомендациями «ВИЧ-инфекция у детей» № 459 (2017 г.).

При анализе привитости использовали информацию из карт профилактических прививок (форма № 063/у), истории развития ребенка (форма № 112/у) и амбулаторной карты пациента (форма № 025/у).

Расчет показателя проводили по так называемым «пропущенным детям» упрощенным методом «отсева», рекомендованным ВОЗ, по формуле:

$$(V1 - V3)/V1 \times 100,$$

где V1 — количество детей, охваченных первой вакцинацией; V3 — количество детей с завершенной вакцинацией.

Для изучения отношения к вакцинации родителей ИВИЧ-детей был проведен опрос 160 человек методом анкетирования. Анкета включала 15 вопросов, часть которых характеризовала их отношение к вакцинации и предпочтительные источники информации о прививках.

В работе использовали эпидемиологические (описательно-оценочный и аналитический) и статистические методы исследования. Определяли сред-

неарифметическую (M), стандартную ошибку показателя (m) и среднее квадратическое отклонение. Оценку достоверности результатов исследования проводили по критерию Пирсона (χ^2) и угловому распределению Фишера (фэмп). За величину уровня статистической значимости принимали $p < 0,05$.

Результаты

ВИЧ-инфекция была выявлена у 198 детей в возрасте от 3 мес до 5 лет, средний возраст постановки диагноза ВИЧ-инфекции соответствовал 15,9 ± 1,5 мес.

Высокоактивную антиретровирусную терапию (ВААРТ) получали 97% детей, время назначения терапии от момента постановки диагноза в среднем составляло 28,1 ± 2,8 мес (95% ДИ 0,3–111,1). Средняя продолжительность жизни с ВИЧ в этой группе составляла 9,7 ± 0,3 года (ДИ 95% 6,2–15,5).

При сравнительной оценке количества CD4-лимфоцитов в динамике болезни на фоне постоянно проводимой ВААРТ их снижения по сравнению с исходными показателями не установлено. В процессе наблюдения отмечено, что доля лиц, имевших на момент постановки диагноза ВИЧ-инфекции проявления выраженного и тяжелого иммунодефицитного состояния, уменьшилась в 37,4 и 25,8 раза соответственно (табл. 1).

При иммунизации детей группы наблюдения ни в раннем, ни в поздних вакцинальных периодах не зарегистрировано снижения абсолютного и относительного количества CD4-лимфоцитов, что свидетельствует о стабильном иммунном статусе пациентов на фоне ВААРТ.

В соответствии с НКПП все новорожденные в первые 24 ч жизни подлежали вакцинации против вирусного гепатита В. Дальнейшая схема иммунизации предполагала двукратное введение вакцины с

интервалом 1 и 5 мес. Для отдельных категорий пациентов, таких как дети, рожденные от женщин — носителей вирусов гепатитов В и С и потребителей инъекционных наркотиков, было предусмотрено введение дополнительной дозы вакцины.

При анализе прививочной документации ИВИЧ-детей было установлено, что 1-е введение вакцины против вирусного гепатита В в родильном доме получили 79,3% детей, а 18,2% были привиты позже, на 1-м году жизни. Основными причинами отсроченной прививки были недоношенность и патология периода новорожденности. По причине позднего старта прививок завершили вакцинацию против вирусного гепатита В к 6 мес только 24,3% (табл. 2).

Полный вакцинальный комплекс в этой когорте получили 91,4% при нормируемом показателе 95%. Часть детей (79,3%), наиболее уязвимых по вирусным гепатитам, подлежали введению дополнительной дозы вакцины, однако получили ее только 46 (29,3%) детей.

Наибольшие сложности при проведении прививок в период новорожденности были при вакцинации БЦЖ. Изменение стратегии ВОЗ в отношении прививок БЦЖ с 2007 по 2017 г. повлияло на полноту и своевременность их проведения. Общий охват вакцинацией против туберкулеза ИВИЧ-детей составлял 46% (91 из 198), хотя 86,2% из них были привиты в родильном доме. При этом до 2007 г. были привиты более половины детей 57 (62,6%), в последующие годы — только 34 (37,4%).

Причинами непривитости против туберкулеза в родильном доме в когорте ИВИЧ были недоношенность (46,8%), отсутствие трехэтапной химио-профилактики перинатального инфицирования ВИЧ (31,9%), а после выписки из родильного дома — подтвержденный диагноз ВИЧ-инфекции.

Таблица 1. Характеристика иммунного статуса ИВИЧ-детей ($n = 198$) в момент постановки диагноза ВИЧ и в процессе наблюдения на фоне проводимой ВААРТ

Table 1. Characteristics of the immune status of children with HIV infection at the time of HIV diagnosis and during follow-up against the background of HAART

Характеристика иммунного статуса Characteristics of the immune status	В момент постановки диагноза ВИЧ-инфекции At the time of diagnosis of HIV infection		В процессе наблюдения на фоне ВААРТ During observation on the background of HAART		Критерий Фишера Fisher's test	p
	абс. / abs	%	абс. / abs	%		
Отсутствие иммунодефицита или незначительный иммунодефицит No or minor immunodeficiency	78	39,4	183	92,4	12,2	<0,01
Умеренный иммунодефицит Moderate immunodeficiency	32	16,2	12	6,1	3,3	<0,01
Выраженный иммунодефицит Expressed immunodeficiency	37	18,7	1	0,5	7,4	<0,01
Тяжелый иммунодефицит Severe immunodeficiency	51	25,8	2	1,0	8,6	<0,01

Таблица 2. Полнота и своевременность вакцинации против вирусного гепатита В детей с ВИЧ-инфекцией (%)
Table 2. Completeness and timeliness of vaccination against viral hepatitis B in children with HIV infection (%)

Срок Time	Вакцинация Vaccination	
	I	III
24 ч / h	79,3	
1–3 мес / months	7,3	
4–6 мес / months	2,6	
6 мес / months		24,3
7–12 мес / months	8,3	58,6
>12 мес / months	2,6	17,1

В группе ЭВИЧ из 216 детей были вакцинированы БЦЖ-М 196 (90,7%), хотя доля привитых в родильном доме не превышала 40% ($p < 0,01$), и большинство были вакцинированы после 6 мес, в том числе каждый 6-й — в возрасте старше 12 мес. В контрольной группе прививку БЦЖ в родильном доме получили 82,8% (табл. 3).

Основными причинами непривитости против туберкулеза в родильном доме у ЭВИЧ-детей были отсутствие трехэтапной химиопрофилактики перинатального инфицирования ВИЧ (35%), патология периода новорожденности и недоношенность (более 40%). В контрольной группе, наряду с патологией периода новорожденности, 35,3% составляли отказы родителей от прививок.

Анализ результатов прививки БЦЖ в группе ЭВИЧ-детей показал, что из 196 привитых против туберкулеза у 141 (71,9%) ребенка в прививочной документации были отмечены размер вакцинального рубца и результаты пробы Манту, в контрольной группе доля таких детей составляла 89%.

Таблица 3. Полнота и своевременность вакцинации против туберкулеза детей, перинатально экспонированных и неэкспонированных ВИЧ

Table 3. Completeness and timeliness of vaccination against tuberculosis in children perinatally exposed and not exposed to HIV

Группа Group	Всего детей All children	Из них / Of them															
		привиты vaccinated		в том числе в сроки / including on time												не привиты not vaccinated	
				до 7 дней before 7 days		с 7 дней до 2 мес from 7 days to 2 months		2–5 мес / months		6–12 мес / months		12–24 мес / months		позже 24 мес after 24 months			
абс. abs	%	абс. abs	%	абс. abs	%	абс. abs	%	абс. abs	%	абс. abs	%	абс. abs	%	абс. abs	%	абс. abs	%
ЭВИЧ HIV exposed	216	196	90,7	74	37,8	3	1,5	3	1,5	81	41,3	29	14,8	6	3,1	20	9,3
Не-ЭВИЧ Not exposed to HIV	100	99	99,0	82	82,8	5	5,1	8	8,1	4	4,0	–	–	–	–	1	1,0

Средний размер вакцинального рубца в группе ЭВИЧ-детей составлял $4,1 \pm 1,2$ мм (95% ДИ 1,9–6,4), в том числе у 65,3% размер вакцинального рубца был более 4 мм, а величина папулы при пробе Манту у 55,3% была более 5 мм и в среднем составляла $8,2 \pm 3,1$ мм (95% ДИ 2,1–14,3).

В контрольной группе данные показатели не отличались от таковых в группе наблюдения. Величина вакцинального рубца была $4,2 \pm 1,3$ мм (95% ДИ 1,8–6,7), а средний размер папулы при пробе Манту — $7,4 \pm 2,2$ мм (95% ДИ 3,2–11,6; табл. 4).

Различий в формировании прививочных реакций у детей исследуемых групп не выявлено, корреляции между размером вакцинального рубца и величиной папулы в ответ на введение туберкулина не установлено.

Вместе с тем были установлены различия в результативности прививки БЦЖ в зависимости от места ее проведения. В группе вакцинированных в родильном доме доля детей с величиной вакцинального рубца более 4 мм и положительной пробой Манту составляла 53 и 46%, против 43 и 36% среди привитых в условиях поликлиники (табл. 5).

С позиций гарантий безопасности прививки БЦЖ в 2013–2019 гг. была проведена сравнительная оценка доли вакцинальных реакций и осложнений у ЭВИЧ-детей в общем количестве осложнений (21) этой прививки, зарегистрированных в медицинских организациях Свердловской области. В их структуре преобладали осложнения 2-й категории (БЦЖ-оститы и БЦЖ-остеомиелиты) — 57,1%, которые были связаны с нарушением инструкции по применению препарата либо с индивидуальной реактивностью ребенка, и 42,9% приходилось на осложнения 1-й категории (регионарные лимфадениты), развитие которых обусловили нарушения техники вакцинации.

Таблица 4. Частота прививочных реакций у детей, вакцинированных против туберкулеза, в анализируемых группах
Table 4. Frequency of vaccination reactions in children vaccinated against tuberculosis in the analyzed groups

Параметр Parameter	ЭВИЧ-дети Children exposed to HIV (n = 141)		Не-ЭВИЧ-дети Children not exposed to HIV (n = 89)		χ ²	p
	абс. abs	%	абс. abs	%		
Вакцинальный рубец ≥4 мм Vaccination scar measuring ≥4 mm	92	65,3	51	57,3	1,5	0,2
Папула при пробе Манту >5 мм Papule with Mantoux test >5 mm	78	55,3	53	59,6	0,4	0,5

В ИВИЧ-группе после прививки БЦЖ были зарегистрированы 4 случая поствакцинальных осложнений, что составило 19% от суммы осложнений прививки БЦЖ, зарегистрированных в Свердловской области: 2 случая регионарного лимфаденита и по 1 случаю генерализованной и диссеминированной БЦЖ-инфекции, последний с летальным исходом. Причиной генерализации процесса было отсутствие трехэтапной химиопрофилактики передачи ВИЧ от матери ребенку и тяжелая форма иммунодефицитного состояния к моменту постановки диагноза ВИЧ-инфекции.

По прививкам против дифтерии, столбняка, коклюша и полиомиелита, старт которых приходится на возраст 3 мес, было установлено, что в ИВИЧ-группе их получили только 33,2% детей, остальные 66,8% были привиты в более старшем возрасте.

Количество медицинских отводов от прививок и отказов родителей было незначительным и не превышало 5%.

В связи с поздним стартом прививок имело место запаздывание окончания вакцинального комплекса, а также 1-й и возрастных ревакцинаций. Во

2-е полугодие жизни были вакцинированы 72,7% детей, 15,3% завершили регламентированный НКПП комплекс только на 2-м году жизни (**табл. 6**).

В результате полный вакцинальный комплекс из 3 введений АКДС-вакцины и полиовакцины получили 176 (88,9%) детей.

Из числа первично вакцинированных АКДС и полиовакциной комплекс из 3 прививок получили 94,2%. Следовательно, число «пропущенных детей» по критериальной оценке ВОЗ составило 5,8%, т.е. было ниже пороговых значений (10%).

Первичную ревакцинацию АКДС и полиовакциной в декретированном возрасте получили 81,3% детей, следовательно, детей с незавершенным комплексом (первичная ревакцинация) было 18,7%, что в 1,9 раза превышало порог, установленный ВОЗ по количеству «пропущенных детей» ($p < 0,01$).

Полнота охвата последующими ревакцинациями против дифтерии и столбняка в декретированном возрасте составляла 63,2–67,7%, против полиомиелита — 67,6–79,8% (**рисунок**) при нормируемом показателе 95%.

В процессе анализа у 70 (37,4%) ИВИЧ-детей были установлены факты иммунизации живой по-

Таблица 5. Результаты вакцинации против туберкулеза в зависимости от места проведения прививки у ЭВИЧ- и не-ЭВИЧ-детей

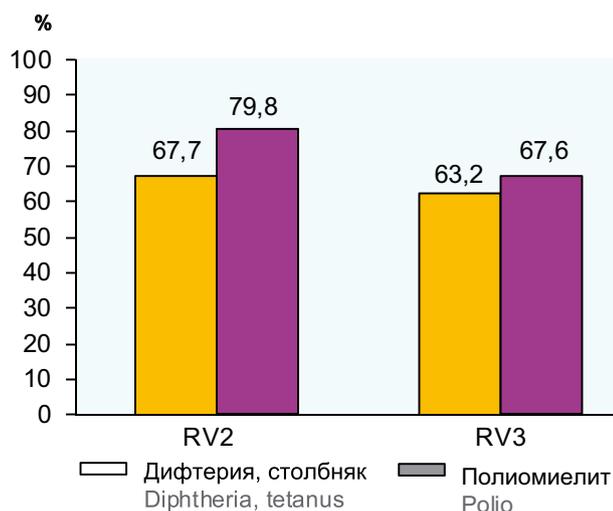
Table 5. Results of vaccination against tuberculosis depending on the place of vaccination in children exposed and not exposed to HIV

Группа Group	Всего привито Totally vaccinated		Из них по месту вакцинации / Of which at the place of vaccination											
			родильный дом / maternity hospital						поликлиника / polyclinic					
			всего total		в том числе / including				всего total		в том числе / including			
					рубец >4 мм scar >4 mm		папула при пробе Манту >5 мм papule with Mantoux test >5 mm				рубец >4 мм scar >4 mm		папула при пробе Манту >5 мм papule with Mantoux test >5 mm	
			абс. abs	%	абс. abs	%	абс. abs	%	абс. abs	%	абс. abs	%	абс. abs	%
ЭВИЧ HIV exposed	196	100,0	74	37,8	39	52,7	34	45,9	122	62,2	53	43,4	44	36,1
Не-ЭВИЧ Not exposed to HIV	99	100,0	82	82,8	45	45,5	46	26,4	17	17,2	6	32,3	7	41,2

Таблица 6. Полнота и своевременность вакцинации против дифтерии, столбняка, коклюша и полиомиелита ИВИЧ-детей (%)

Table 6. Completeness and timeliness of vaccination against diphtheria, tetanus, pertussis and poliomyelitis in HIV-infected children (%)

Срок, мес Time, months	Вакцинация Vaccination		Ревакцинация Revaccination
	I	II	
3	33,2		
4–6	31,6		
6		11,9	
7–12	25,7	72,7	
>12	9,6	15,3	
18			13
>18		87	



Привитость против дифтерии, столбняка и полиомиелита детей с ВИЧ-инфекцией.

Vaccination against diphtheria, tetanus and poliomyelitis in children with HIV infection.

лиомиелитной вакциной, хотя ни у одного из привитых не было зарегистрировано постпрививочных реакций.

При анализе своевременности вакцинации против краснухи, кори и эпидемического паротита нельзя не отметить, что, несмотря на нарушения графика календарных прививок, против краснухи были привиты 95,5%, а против кори и эпидемического паротита — 96,7% детей, в том числе 63% в декретированном возрасте.

Ревакцинация против кори и эпидемического паротита была проведена у 86,6% детей, против краснухи — у 84,1%, в том числе в декретированном возрасте — у 76,1 и 64,6% соответственно.

Для оценки отношения к прививкам родителей детей с ВИЧ-инфекцией был проведен опрос

160 респондентов; из них 83,1% были родителями и 16,9% — опекунами. Большинство (70%) респондентов относились к возрастной группе до 40 лет; 81,3% имели среднее специальное и высшее образование.

Значительная доля (85%) респондентов считали, что прививки необходимы, т.к. они защищают от инфекционных заболеваний, хотя каждый десятый (11,3%) из опрошенных не определился с ответом и 3,8% были против вакцинации.

Наиболее значимыми для родителей и опекунов были прививки против туберкулеза (78,1%) и вирусного гепатита (77,5%). Рейтинги прививок против кори, краснухи и эпидемического паротита, коклюша, дифтерии и столбняка были несколько ниже (73,1%).

Среди родителей, которые сомневались в эффективности прививок и были против них, основной причиной было беспокойство по поводу возникновения поствакцинальных реакций (42,4%) и отсутствия гарантированной защиты от инфекции после вакцинации (36,4%). У детей 57 (35,6%) респондентов были зарегистрированы обычные реакции после постановки прививок. Наиболее часто (64,4%) возникали общие реакции в виде подъема температуры тела до 38°C и общего недомогания, и у 30% были местные реакции.

Для уточнения источников получения информации о прививках родителям предложили проранжировать эти источники и их значимость по 7 позициям (медицинские работники, родственники, знакомые, телевидение, информация из СМИ, печатная продукция), указав наиболее авторитетные для них. Установлено, что из источников получения информации на 1-й ранговой позиции во всех группах были медицинские работники (66,7–92,6%); на 2-й и 3-й — интернет и печатная продукция (табл. 7).

Наиболее авторитетным источником информации для лиц, положительно настроенных по отношению к прививкам, и даже среди сомневающихся в их эффективности были медицинские работники (98,5 и 72,2%). Лица, негативно относящиеся к вакцинации, считали, что имеют собственное мнение о прививках, однако источником информации у 33,3% из них также были медицинские работники.

Обсуждение

В современных условиях в отношении детей, рожденных от ИВИЧ-женщин, сохраняется неоднозначное толкование понятия «иммунодефицит», хотя известно, что ВИЧ-инфекция сама по себе не всегда определяет наличие иммунодефицита.

При положительной практике вакцинопрофилактики ИВИЧ- и ЭВИЧ-детей в Свердловской области вопросы тактики иммунизации живыми вакцинами требуют обсуждения.

Целесообразность вакцинации должна рассматриваться в контексте сравнительной оценки поль-

Таблица 7. Источники получения информации о прививках среди родителей и опекунов ИВИЧ-детей (%)
Table 7. Sources of information on vaccinations among parents and guardians of children with HIV infection (%)

Источник информации Sources of information	Отношение родителей к иммунизации / Parental attitudes towards immunization		
	положительное / positive (n = 136)	неоднозначное / ambiguous (n = 18)	негативное / negative (n = 6)
Медицинские работники Medical workers	92,6	77,7	66,7
Телевидение, радио Television, radio	1,5	5,6	0,0
Интернет Internet	2,9	11,1	16,7
Печатная продукция Printed products	2,2	0,0	0,0
Научные исследования Scientific research	0,0	0,0	16,6
Коллеги по месту работы Colleagues	0,7	0,0	0,0
Не имею информации I have no information	0,0	5,6	0,0
	Наиболее авторитетный источник Most authoritative source		
Медицинские работники Medical workers	98,5	72,2	33,3
Телевидение, радио Television, radio	0,7	0,0	0,0
Интернет Internet	–	5,6	16,7
Родственники Relatives	0,7	0	16,7
Родители других детей, знакомые Parents of other children, acquaintances	0,0	5,6	0,0
Научная литература Scientific literature	0,0	0,0	16,7
Собственное мнение Own opinion	0,0	16,7	16,7

зы, которую она может принести, и опасности осложнений, которые она может вызвать, с поиском компромисса.

В проведенном исследовании по оценке своевременности и полноты вакцинации ИВИЧ- и ЭВИЧ-детей установлено, что полнота охвата их прививками против большинства инфекций согласно НКПП составляла 94,4–97,5%.

Наибольшие затруднения в части соблюдения календарных сроков прививок возникали в отношении детей в возрасте до 2 лет, на который приходится наибольшее количество профилактируемых инфекций и число введений иммунобиологических лекарственных препаратов.

В период новорожденности наиболее низкие показатели охвата прививками в родильном доме были при вакцинации против туберкулеза. Причиной отсроченной прививки БЦЖ у ЭВИЧ-детей было отсутствие трехэтапной химиофилактики, тогда как у ИВИЧ-детей — неоднократно менявшаяся стратегия проведения прививок БЦЖ и нор-

мативная база. В результате около 60% ЭВИЧ-детей были привиты против туберкулеза только во 2-м полугодии жизни. Итоговые показатели полноты охвата прививками против туберкулеза в этой когорте составили 90,3%, хотя и отставали от аналогичных показателей в контрольной группе здоровых детей (98%).

При сравнительной оценке частоты формирования вакцинального рубца в группах наблюдения и контрольной, а также поствакцинальной аллергии по результатам пробы Манту достоверных различий не установлено, что подтверждает результаты других исследований, где детей, рожденных от ИВИЧ-матерей, прививали вакциной БЦЖ-М на 3–7-й день жизни при отсутствии общих противопоказаний для вакцинации против туберкулеза [8].

Более того, у детей, получивших прививку БЦЖ в родильном доме, частота формирования вакцинального рубца и поствакцинальной аллергии была даже несколько выше по сравнению с привитыми в поликлинике: 53 и 46% против 43 и 36%.

В анамнезе у 35,6% ИВИЧ-детей были зарегистрированы реакции на прививки, в структуре которых 64,4% составляли общие реакции в виде подъема температуры тела до 38°C и 30% — местные.

В процессе исследования были проанализированы 4 случая поствакцинальных осложнений 2-й категории в ответ на введение вакцины БЦЖ. Причинами возникновения осложнений стало иммунодефицитное состояние вследствие отсутствия трехэтапной химиопрофилактики передачи ВИЧ от матери ребенку и тяжелая форма иммунодефицитного состояния к моменту постановки диагноза ВИЧ-инфекции.

В исследованиях других авторов показана абсолютная безопасность ранней вакцинации БЦЖ-М детей с реализованной перинатальной ВИЧ-инфекцией при отсутствии поствакцинальных осложнений [8].

«Упущенные возможности» иммунизации в декретированных возрастных группах приводят к пролонгированию сроков завершения вакцинального комплекса прививок против вирусного гепатита В, коклюша, дифтерии, столбняка и полиомиелита, в том числе возрастных ревакцинаций, и нарушению календарного графика прививок против кори, краснухи и эпидемического паротита. Аналогичные выводы были сделаны учеными из Китая, где охват прививками ИВИЧ-детей в рамках Национального календаря составлял 70,9–77,7%, что было значительно ниже, чем на общенациональном уровне ($\geq 97\%$) [9].

ВААРТ является гарантом безопасности иммунизации ИВИЧ-детей, особенно в случаях применения живых вакцин, т.к. снижает вирусную нагрузку и риски формирования иммунодефицитного состояния. У детей с выраженным и тяжелым иммунодефицитным состоянием назначение ВААРТ приводит к восстановлению абсолютного и относительного количества CD4-лимфоцитов.

Данные об изучении приверженности прививкам родителей ИВИЧ-детей свидетельствовали об их понимании необходимости вакцинопрофилактики как инструмента сбережения здоровья. В этой когорте наиболее авторитетным источником информации о прививках были медицинские работники.

В данной статье не представлены материалы по оценке гуморального иммунитета к вводимым вакцинным антигенам, т.к. их результаты находятся в обработке.

Заключение

Проведен анализ полноты и своевременности вакцинации в когорте ИВИЧ- и ЭВИЧ-детей, по результатам которого было установлено, что охват прививками детей в рамках НКПП составил 94,4–97,5%, однако были выявлены нарушения

сроков проведения прививок в декретированном возрасте.

Благодаря проводимой ВААРТ количество CD4-лимфоцитов не снижалось по сравнению с исходными параметрами в момент постановки диагноза ВИЧ-инфекции, что является гарантом безопасной иммунизации ИВИЧ-детей.

Согласно результатам исследования вакцинация ЭВИЧ-детей против туберкулеза возможна в родильном доме при наличии трехэтапной химиопрофилактики перинатальной передачи ВИЧ и отсутствии общих противопоказаний. ЭВИЧ-дети иммунокомпетентны и при введении вакцины БЦЖ-М способны формировать вакцинальный рубец (65,3% случаев) и поствакцинальную аллергию (55,3%), что не отличает их от детей контрольной группы.

Результаты изучения специфического иммунитета у детей будут представлены в следующей публикации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Брико Н.И., Фельдблюм И.В. Иммунопрофилактика инфекционных болезней в России: состояние и перспективы совершенствования. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2017; 16(2): 4-9.
2. Медицинский научно-методический портал «Лечащий врач». Брико Н.И. Оценка качества и эффективности иммунопрофилактики. Available at: <http://www.lvrach.ru/2012/10/15435557> (Дата обращения: 20.04.2020)
3. Фельдблюм И.В. Современные проблемы вакцинопрофилактики (научный обзор). *Профилактическая и клиническая медицина*. 2017; (2): 20-5.
4. Шугаева С.Н., Петрова А.Г. Опыт ранней щадящей иммунизации вакциной БЦЖ-М детей с перинатальным контактом по ВИЧ. *Детские инфекции*. 2014; (2): 34-6.
5. Клевно Н.И., Аксенова В.А. Туберкулезная вакцина БЦЖ: иммунологическая и клиническая эффективность у детей, рожденных от женщин с ВИЧ-инфекцией. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018; 18(2): 114-20. DOI: <http://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-2-114-120>
6. Hu Y.Y., Xiong R., Tang H.L., He J.M., Zheng J., Zhang P.F., et al. An investigation of vaccination in children with human immunodeficiency virus infection. *Chin. J. Contemp. Pediatr*. 2019; 21(3): 199-202. (in Chinese)
7. Снегова Н.Ф., Пахомов Д.В., Костинов М.П., Ильина Н.И. Поствакцинальный иммунитет к дифтерии, столбняку, полиомиелиту у детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями. *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского*. 2019; 98(2): 54-63. DOI: <http://doi.org/10.24110/0031-403X-2019-98-2-54-63>
8. Снегова Н.Ф., Костинов М.П., Пахомов Д.В., Ильина Н.И. Вакцинация против кори детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями (клинико-иммунологические аспекты). *Инфекция и иммунитет*. 2019; 9(2): 325-36. DOI: <http://doi.org/10.15789/2220-7619-2019-2-325-336>
9. WHO. BCG Vaccines: WHO Position Paper – February 2018. *Wkly Epidemiol. Rec*. 2018; 93(8): 73-96.
10. Mutsaerts E.A.M.L., Nunes M.C., van Rijswijk M.N., Klipstein-Grobusch K., Grobbee D.E., Madhi S.A. Safety and immunogenicity of measles vaccination in HIV-infected and HIV-exposed uninfected children: a systematic review and meta-analysis. *EClinicalMedicine*. 2018; 1: 28-42. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.eclinm.2018.06.002>

REFERENCES

1. Briko N.I., Fel'dblyum I.V. Immunoprophylaxis of infectious diseases in Russia: condition and perspective of improvement. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2017; 16(2): 4-9. (in Russian)
2. Medical Scientific and Methodological Portal «Lechashchiy vrach». Briko N.I. Assessment of immunoprophylaxis quality and efficiency. Available at: <http://www.lvrach.ru/2012/10/15435557> (Accessed 20.04.2020) (in Russian)
3. Fel'dblyum I.V. Modern issues of vaccinal prevention. *Profilakticheskaya i klinicheskaya meditsina*. 2017; (2): 20-5. (in Russian)
4. Shugaeva S.N., Petrova A.G. Practice of early reduced-antigenic-load BCG-M vaccination of HIV-exposed infants. *Detskie infektsii*. 2014; (2): 34-6. (in Russian)
5. Klevno N.I., Aksenova V.A. BCG tuberculosis vaccine: immunological and clinical efficacy in children born to HIV-infected women. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie*. 2018; 18(2): 114-20. DOI: <http://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-2-114-120> (in Russian)
6. Hu Y.Y., Xiong R., Tang H.L., He J.M., Zheng J., Zhang P.F., et al. An investigation of vaccination in children with human immunodeficiency virus infection. *Chin. J. Contemp. Pediatr.* 2019; 21(3): 199-202. (in Chinese)
7. Snegova N.F., Pakhomov D.V., Kostinov M.P., Il'ina N.I. Post-vaccination immunity to diphtheria, tetanus, poliomyelitis in children born by HIV-infected mothers. *Pediatriya. Zhurnal im. G.N. Speranskogo*. 2019; 98(2): 54-63. DOI: <http://doi.org/10.24110/0031-403X-2019-98-2-54-63> (in Russian)
8. Snegova N.F., Kostinov M.P., Pakhomov D.V., Il'ina N.I. Measles vaccination of children born to HIV-infected mothers (clinical and immunological aspects). *Infektsiya i immunitet*. 2019; 9(2): 325-36. DOI: <http://doi.org/10.15789/2220-7619-2019-2-325-336> (in Russian)
9. WHO. BCG Vaccines: WHO Position Paper – February 2018. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2018; 93(8): 73-96.
10. Mutsaerts E.A.M.L., Nunes M.C., van Rijswijk M.N., Klipstein-Grobusch K., Grobbee D.E., Madhi S.A. Safety and immunogenicity of measles vaccination in HIV-infected and HIV-exposed uninfected children: a systematic review and meta-analysis. *EClinicalMedicine*. 2018; 1: 28-42. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.eclinm.2018.06.002>

Информация об авторах:

Кукаркина Вера Анатольевна[✉] — врач-эпидемиолог ГБУЗ СО «Областной центр профилактики и борьбы со СПИД», 620102, Екатеринбург, Россия; аспирант каф. эпидемиологии, социальной гигиены и организации госсанэпидслужбы ФГБОУ ВО «Уральский ГМУ», 620014, Екатеринбург, Россия. ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-9723-8116>. E-mail: verakukarkina@yandex.ru

Голубкова Алла Александровна — д.м.н., проф., в.н.с. лаб. инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, 111123, Москва, Россия. ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0003-4812-2165>. E-mail: allagolubkova@yandex.ru

Подымова Анжелика Сергеевна — д.м.н., главный врач ГБУЗ СО «Областной центр по профилактике и борьбе со СПИД», 620102, Екатеринбург, Россия. ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-7345-0801>. E-mail: glvrach@livehiv.ru

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

Information about the authors:

Vera A. Kukarkina[✉] — epidemiologist, Regional Center for the Prevention and Control of AIDS, 620102, Yekaterinburg, Russia; graduate student, Department of epidemiology, social hygiene and organization of the state sanitary and epidemiological service, Ural State Medical University, 620014, Yekaterinburg, Russia. ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-9723-8116>. E-mail: verakukarkina@yandex.ru

Alla A. Golubkova — D.Sci. (Med.), Prof., leading researcher, Laboratory of infections associated with the provision of medical care, Central Research Institute of Epidemiology, 111123, Moscow, Russia. ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0003-4812-2165>. E-mail: allagolubkova@yandex.ru

Anzhelika S. Podymova — D.Sci. (Med.), Chief physician, Regional Center for the Prevention and Control of AIDS, 620102, Yekaterinburg, Russia. ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-7345-0801>. E-mail: glvrach@livehiv.ru

Contribution: the authors contributed equally to this article.