

1

ЯНВАРЬ – ФЕВРАЛЬ

Том 98
2021

Ж
М
Э
И

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

ЖУРНАЛ
МИКРОБИОЛОГИИ
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И
ИММУНОБИОЛОГИИ

JOURNAL

OF MICROBIOLOGY
EPIDEMIOLOGY
AND
IMMUNOBIOLOGY

1

JANUARY – FEBRUARY

VOLUME 98
2021

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

ЖУРНАЛ МИКРОБИОЛОГИИ, ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ИММУНОБИОЛОГИИ

(Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii)

Двухмесячный научно-практический журнал

Основан в 1924 г.

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

Журнал входит в 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)

1

ЯНВАРЬ – ФЕВРАЛЬ

**ТОМ 98
2021**

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 информиро-
вания читателей об изменениях
в опубликованных статьях.

При публикации статьи на русском
и английском языках статья
размещается под одним DOI.

**Журнал представлен
в международных базах данных
и информационно-справочных
системах:**
SCOPUS, Russian Science Citation
Index (RSCI), интегрированная с
платформой Web of Science; DOAJ;
Ulrich's Periodicals Directory, ROAD;
EBSCO Publishing (на платформе
EBSCOhost).

ПОДПИСКА:
«Объединенный каталог. Пресса
России. Газеты и журналы»,
подписные индексы: E71436, 71436.

**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. Новогиревская, д. 3А.
Тел.: +7(495) 974-96-46.
E-mail: cric@pccr.ru

РЕДАКЦИЯ:
105064 г. Москва,
Малый Казенный пер., д. 5А.
Тел.: +7(925)011-87-79.
E-mail: jmei@cric.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 24.02.2020.
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, 2021

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., главный научный сотрудник лабораторией эпидемиологии природно-очаговых инфекций, ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Российские члены редакционной коллегии

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

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

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

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

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

Горелов А.В., д.м.н., проф., член-корр. РАН, зам. директора по научной работе ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

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

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

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

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

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

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

Иностранные члены редакционной коллегии

Shubhada Voprengame, 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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Игнатьев Г.М., д.м.н., проф., зам. рук. направления качества и инновационных разработок ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунологических препаратов им. М.П. Чумакова» РАН, Москва, Россия

Кюрегян К.К., д.б.н., проф., зав. отделом изучения вирусных гепатитов НИИ молекулярной и персонализированной медицины ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования», Москва, Россия

Мескина Е.Р., д.м.н., зав. отделением детских инфекций отдела терапии, ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», Москва, Россия

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

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

Несвижский Ю.В., д.м.н., проф., проф. кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. А.А. Воробьева, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва

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

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

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

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

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

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

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

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

Шаркова В.А., д.м.н., проф., зав. кафедрой микробиологии и вирусологии, Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток

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

Мефед К.М., к.б.н., зам. генерального директора по трансферу лекарственных средств, ООО «БиоИнтегратор», группа компаний «ХимРАР», Москва, Россия

Мионов К.О., д.м.н., рук. научной группы разработки новых методов выявления генетических полиморфизмов, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

Никонова А.А., к.б.н., зав. лаб. молекулярной биотехнологии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Шендеров Б.А., д.м.н., проф., Проблемная научно-исследовательская лаборатория «Конструирование и внедрение продуктов и рационов персонализированного питания» Московский государственный университет технологий им. К.Г. Разумовского, Москва, Россия

FOUNDERS:
Central Research Institute of 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)

1

JANUARY – FEBRUARY

VOLUME 98

2021

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.

When publishing an article in Russian and English, the article is placed under the same DOI.

The journal is presented in the following research databases: SCOPUS, Russian Science Citation Index (RSCI) database, integrated in Web of Science; DOAJ; Ulrich's Periodicals Directory, ROAD; EBSCO Publishing (on the EBSCOhost platform).

Index for subscription to the printed version of the journal: United directory. Press of Russia. Newspapers and magazines: E71436, 71436.

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 of 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 February 24, 2020.
Print format 60×90^{1/8}.
Circulation 250 copies.

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

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), chief researcher, Laboratory of Zoonoses, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

EDITORIAL BOARD

Russian members of the Editorial Board

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

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

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

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

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

Alexandr V. Gorelov, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Deputy Director for Scientific Research, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow

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

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

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

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

Alexander N. Lukashov, 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

Rinat A. Maksyutov, Dr. Sci. (Biology), Director General, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Novosibirsk

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

EDITORIAL COUNCIL

Georgy M. Ignatyev, Dr. Sci. (Medicine), Professor, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products, Moscow, Russia

Karen K. Kyuregyan, Dr. Sci. (Biology), Professor, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education; I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

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

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

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

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

Yury V. Nesvizhsky, Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of microbiology, virology and immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

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

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

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

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

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

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

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

Sergey V. Cherkasov, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch of RAS, Orenburg

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

Kirill M. Mefed, Cand. Sci. (Biology), BioIntegrator LLC (HimRaR group of companies), Moscow, Russia

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

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

Boris A. Shenderov, Dr. Sci. (Medicine), Professor, K.G. Razumovskiy Moscow State University of Technology, Moscow, Russia

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Троценко О.Е., Зайцева Т.А., Лялина Л.В., Гарбуз Ю.А., Смирнов В.С., Ломоносова В.И., Балахонцева Л.А., Котова В.О., Базыкина Е.А., Бутакова Л.В., Сапега Е.Ю., Алейникова Н.В., Бебенина Л.А., Лосева С.М., Каравянская Т.Н., Тополян А.А.** Уровень серопревалентности к SARS-CoV-2 среди жителей Хабаровского края на фоне эпидемии COVID-19..... 7
- Валутите Д.Э., Семенов А.В., Останкова Ю.В., Козлов К.В., Борисов А.Г., Назаров В.Д., Тополян А.А.** Выявление мутаций лекарственной устойчивости вируса гепатита С у пациентов с неэффективной терапией препаратами прямого противовирусного действия* 18
- Годовалов А.П., Карпунина Н.С., Карпунина Т.И.** *Moraxella osloensis* в микробиоте репродуктивного тракта при бесплодии: случайные находки или маркеры патологии? 28
- Ильин В.К., Орлов О.И., Рыкова М.П., Комиссарова Д.В., Усанова Н.А., Антропова Е.Н., Кутько О.В., Калинин С.А., Пономарев С.А., Шеф К.А., Сахарова А.В.** Состав микрофлоры и состояние системы сигнальных образ-распознающих рецепторов семейства Toll-подобных клеточных факторов врожденного иммунитета во время 120-суточной изоляции в гермообъекте с искусственной средой обитания 36
- Ковалев Д.А., Шапаков Н.А., Писаренко С.В., Савельева И.В., Васильева О.В., Савельев В.Н., Сирица Ю.В., Жиров А.М., Ульшина Д.В., Кузнецова И.В., Бобрышева О.В., Куличенко А.Н.** Генетическое типирование штаммов *Vibrio cholerae* биовара El Tor, выделенных на территории Кавказа в период 1970–1998 гг., с применением MLVA-5 и wgSNP 46
- Аджиева А.А., Данилова Т.А., Данилина Г.А., Шевлягина Н.В., Минко А.Г., Жуховицкий В.Г.** Влияние антибиотиков на образование биопленки *Streptococcus pyogenes* в условиях *in vitro* 59

ОБЗОРЫ

- Благонравова А.С., Жилыева Т.В., Квашнина Д.В.** Нарушения кишечной микробиоты при расстройствах аутистического спектра: новые горизонты в поиске патогенетических подходов к терапии. Часть 1. Особенности кишечной микробиоты при расстройствах аутистического спектра 65
- Андрюков Б.Г., Тимченко Н.Ф., Ляпун И.Н., Бынина М.П., Матосова Е.В.** Гетерогенность в изогенных популяциях бактерий и современные технологии клеточного фенотипирования 73
- Василенко Н.Ф., Прислегина Д.А., Малецкая О.В., Таран Т.В., Платонов А.Е., Куличенко А.Н.** Заболеваемость арбовирусными инфекциями на юге европейской части Российской Федерации 84
- Лобзин Ю.В., Кветная А.С., Скрипченко Н.В., Железова Л.И.** Современные представления об этиопатогенетических и генетических особенностях токсинов *Clostridium perfringens* 91
- Петрова С.Ю., Хлгатын С.В., Бержец В.М., Васильева А.В.** Аллергенсодержащие вакцины для специфической иммунотерапии 104

ИСТОРИЯ НАУКИ

- Морозова О.М., Трошина Т.И., Морозова Е.Н., Морозов А.Н.** Пандемия испанки 1918 года в России. Вопросы сто лет спустя 113

НЕКРОЛОГИ

- Памяти Евгения Николаевича Беляева 125
- Памяти Николая Николаевича Филатова 127

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

CONTENTS

ORIGINAL RESEARCHES

Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Melnikova A.A., Trotsenko O.E., Zaitseva T.A., Lyalina L.V., Garbuz Yu.A., Smirnov V.S., Lomonosova V.I., Balakhontseva L.A., Kotova V.O., Bazykina E.A., Butakova L.V., Sapega E.Yu., Aleinikova N.V., Bebenina L.A., Loseva S.M., Karavyanskaya T.N., Totolyan A.A. The seroprevalence of SARS-CoV-2 among residents of the Khabarovsk Krai during the COVID-19 epidemic.....	7
Valutite D.E., Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Kozlov K.V., Borisov A.G., Nazarov V.D., Totolian A.A. Detection of drug resistance mutations of hepatitis C virus in patients with failure of the treatment with direct acting antivirals*	18
Godovalov A.P., Karpunina N.S., Karpunina T.I. <i>Moraxella osloensis</i> as a part of genital tract microbiota in infertility: incidental findings or pathology markers?.....	28
Ilyin V.K., Orlov O.I., Rykova M.P., Komissarova D.V., Usanova N.A., Antropova E.N., Kut'ko O.V., Kalinin S.A., Ponomarev S.A., Shef K.A., Sakharova A.V. Composition of microflora and state of the system of signal image-recognizing receptors of the cell factors Toll-like family of innated immunity during 120-day isolation in sealed compartment.....	36
Kovalev D.A., Shapakov N.A., Pisarenko S.V., Savel'eva I.V., Vasil'eva O.V., Savel'ev V.N., Siritsa Yu.V., Zhiron A.M., Ul'shina D.V., Kuznecova I.V., Bobrysheva O.V., Kulichenko A.N. Genetic typing of <i>Vibrio cholerae</i> strains biovar El Tor isolated from the Caucasus region during the 1970–1998 period using MLVA-5 and wgSNP	46
Adzhieva A.A., Danilova T.A., Danilina G.A., Shevlyagina N.V., Minko A.G., Zhukhovitsky V.G. Influence of antibiotics on biofilm formation by <i>Streptococcus pyogenes in vitro</i>	59

REVIEWS

Blagonravova A.S., Zhilyaeva T.V., Kvashnina D.V. Dysbiosis of intestinal microbiota in autism spectrum disorders: new horizons in search for pathogenetic approaches to therapy. Part 1. Features of intestinal microbiota in autism spectrum disorders	65
Andryukov B.G., Timchenko N.F., Lyapun I.N., Bynina M.P., Matosova E.V. Heterogeneity in isogenic bacteria populations and modern technologies of cell phenotyping	73
Vasilenko N.F., Prislegina D.A., Maletskaya O.V., Taran T.V., Platonov A.E., Kulichenko A.N. Arbovirus infections incidence in the south of the European part of the Russian Federation	84
Lobzin Yu.V., Kvetnaya A.S., Skripchenko N.V., Zhelezova L.I. Current notions about etiopathogenic and genetics specific features of <i>Clostridium perfringens</i> toxins.....	91
Petrova S.Yu., Khlgatian S.V., Berzhets V.M., Vasileva A.V. Allergy vaccines for specific immunotherapy.....	104

HISTORY OF SCIENCE

Morozova O.M., Troshina T.I., Morozova E.N., Morozov A.N. The Spanish flu pandemic in 1918 in Russia. Questions a hundred years later.....	113
---	-----

OBITUARIES

In memory of Evgeny Nikolaevich Belyaev	125
In memory of Nikolay Nikolaevich Filatov.....	127

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-92>



Уровень серопревалентности к SARS-CoV-2 среди жителей Хабаровского края на фоне эпидемии COVID-19

Попова А.Ю.¹, Ежлова Е.Б.¹, Мельникова А.А.¹, Троценко О.Е.², Зайцева Т.А.³,
Лялина Л.В.⁴, Гарбуз Ю.А.⁵, Смирнов В.С.⁴, Ломоносова В.И.⁴, Балахонцева Л.А.²,
Котова В.О.², Базыкина Е.А.², Бутакова Л.В.², Сапега Е.Ю.², Алейникова Н.В.²,
Бибенина Л.А.², Лосева С.М.³, Каравянская Т.Н.³, Тотолян А.А.⁴

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

²Хабаровский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии, Хабаровск, Россия;

³Управление Роспотребнадзора по Хабаровскому краю, Хабаровск, Россия;

⁴Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

⁵Центр гигиены и эпидемиологии в Хабаровском крае, Хабаровск, Россия

Аннотация

Введение. В Хабаровском крае первые 3 случая заболевания COVID-19 диагностированы 19 марта 2020 г., они были завозными из Аргентины (транзит через Италию). Эпидемический процесс COVID-19 в Хабаровском крае характеризуется медленным нарастанием заболеваемости, в период проведения исследования серопревалентности к вирусу SARS-CoV-2 показатели заболеваемости варьировали от 35,9 до 39,1 на 100 тыс. населения. В последующие 5 нед продолжился рост заболеваемости, максимальный уровень составил 67,3 на 100 тыс. населения. Статистически значимое снижение заболеваемости отмечалось в первой декаде августа.

Цель. Определение уровня и структуры популяционного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 среди населения Хабаровского края в период интенсивного распространения COVID-19 (с 9 по 21 июня 2020 г.).

Материалы и методы. Работа проводилась в рамках первого этапа широкомасштабного проекта Роспотребнадзора по оценке популяционного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 среди населения России с учетом протокола, рекомендованного ВОЗ. Отбор волонтеров для исследования проводили методом анкетирования и рандомизации путем случайной выборки. В анализ включены результаты обследования 2675 человек. Количество волонтеров во всех возрастных группах было сопоставимым.

Результаты. Коллективный иммунитет населения Хабаровского края составил 19,6%. Максимальный уровень популяционного иммунитета установлен у детей 14–17 (34,4%) и 7–13 лет (24,8%), лиц старше 70 лет (22,6%). Наибольший уровень серопозитивности, кроме детей и пожилых, выявлен среди работников образования (26,7%), наименьший — у военных (8,7%) и безработных (8,3%). Статистически значимых различий по уровню серопревалентности между мужчинами и женщинами не установлено.

Выводы. В результате сероэпидемиологического исследования показано, что в Хабаровском крае при наличии контактов с больными COVID-19 вероятность сероконверсии увеличилась в 1,4 раза. После перенесенной инфекции COVID-19 антитела выявлялись в 58,9% случаев. У лиц с позитивным результатом ПЦР-анализа, полученным ранее, антитела выявлены в 50% случаев. Установлена высокая доля бессимптомной инфекции среди серопозитивных волонтеров — 93,7%.

Ключевые слова: *коронавирусная инфекция, эпидемия, серопревалентность, заболеваемость, Хабаровский край, население*

Для цитирования: Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Троценко О.Е., Зайцева Т.А., Лялина Л.В., Гарбуз Ю.А., Смирнов В.С., Ломоносова В.И., Балахонцева Л.А., Котова В.О., Базыкина Е.А., Бутакова Л.В., Сапега Е.Ю., Алейникова Н.В., Бибенина Л.А., Лосева С.М., Каравянская Т.Н., Тотолян А.А. Уровень серопревалентности к SARS-CoV-2 среди жителей Хабаровского края на фоне эпидемии COVID-19. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021; 98(1): 7–17.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-92>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-92>

The seroprevalence of SARS-CoV-2 among residents of the Khabarovsk Krai during the COVID-19 epidemic

Anna Yu. Popova¹, Elena B. Ezhlova¹, Albina A. Melnikova¹, Olga E. Trotsenko², T.A. Zaitseva³, Lyudmila V. Lyalina⁴, Yu.A. Garbuz⁵, Vyacheslav S. Smirnov⁴, Valeria I. Lomonosova⁴, Lyudmila A. Balakhontseva², Valeria O. Kotova², Elena A. Bazykina², Lyudmila V. Butakova², Elena Yu. Sapega², Nadezhda V. Aleinikova², Larisa A. Bebenina², Svetlana M. Loseva³, Tatiana N. Karavyanskaya³, Areg A. Totolyan⁴

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

²Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russia;

³Rospotrebnadzor Office for the Khabarovsk Krai, Khabarovsk, Russia;

⁴St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia;

⁵Center for Hygiene and Epidemiology in the Khabarovsk Krai, Khabarovsk, Russia

Abstract

Introduction. The coronavirus disease (COVID-19) pandemic was announced by WHO in February 2020. In the Khabarovsk Krai, the first three cases of the disease were diagnosed on March 19, 2020, these cases were imported from Argentina (transit through Italy). The epidemic process of COVID-19 in the Khabarovsk Krai is characterized by a slow increase in the incidence. During the period of time when the SARS-CoV-2 seroprevalence study was conducted the incidence rates varied from 35.9 to 39.1 per 100 thousand population. Within the next 5 weeks the incidence continued to increase, the maximum level was 67.3 per 100 thousand population. A statistically significant decrease in the incidence is noted in the first decade of August. The study of the SARS-CoV-2 seroprevalence among residents of the region was carried out from June 9 to June 21, 2020 during the period of increasing intensity of the epidemic process of COVID-19 infection.

Aim. To determine the level and structure of herd immunity to SARS-CoV-2 virus among the population of the Khabarovsk Krai during the period of intensive spread of COVID-19.

Materials and methods. The study was conducted as a part of the first stage of a large-scale Rospotrebnadzor project to assess the herd immunity to SARS-CoV-2 virus among the population of the Russian Federation, taking into consideration the protocol recommended by WHO. The selection of volunteers for the study was carried out by the method of questionnaires and randomization by random sampling. The results of a survey of 2675 individuals were included into analysis. The number of volunteers in all age groups was similar.

Results. The results of the study showed that the herd immunity to SARS-CoV-2 in the total population of the Khabarovsk Krai was 19.6%. The maximum level of herd immunity was observed in children 14–17 years old (34.4%), children 7–13 years old (24.8%), and people over 70 years (22.6%). The highest level of seropositivity, except for the children and the elderly, was found among educational workers (26.7%). The lowest level of seropositivity was found in the military (8.7%) and the unemployed (8.3%). There were no statistically significant differences in the level of seroprevalence between men and women.

Conclusions. The results of the seroepidemiological study demonstrated that in the Khabarovsk Krai, the presence of the contacts with COVID-19 patients is associated with the 1.4-fold increase in the likelihood of the seroconversion. Antibodies were detected in 58.9% of the past COVID-19 cases. In individuals with the previous positive PCR test result, antibodies were detected in 50% of cases. A high rate of asymptomatic infection, up to 93.7%, was observed among seropositive volunteers.

Keywords: coronavirus infection, epidemic, seroprevalence, morbidity, Khabarovsk Krai, population

For citation: Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Melnikova A.A., Trotsenko O.E., Zaitseva T.A., Lyalina L.V., Garbuz Yu.A., Smirnov V.S., Lomonosova V.I., Balakhontseva L.A., Kotova V.O., Bazykina E.A., Butakova L.V., Sapega E.Yu., Aleinikova N.V., Bebenina L.A., Loseva S.M., Karavyanskaya T.N., Totolyan A.A. The seroprevalence of SARS-CoV-2 among residents of the Khabarovsk Krai during the COVID-19 epidemic. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(1):7–17. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-92>

Введение

Пандемия COVID-19 была объявлена ВОЗ в феврале 2020 г. [1]. Инфекция распространяется с такой скоростью, которая заставляет ученых и политиков всего мира предпринимать беспрецедентные меры контроля эпидемического процесса.

В Хабаровском крае первые 3 случая заболевания диагностированы 19 марта 2020 г., эти случаи были завозными из Аргентины (транзит через Италию). Эпидемический процесс COVID-19 в Хабаровском крае характеризовался медленным нарастанием заболеваемости в течение 18 нед (рис. 1).

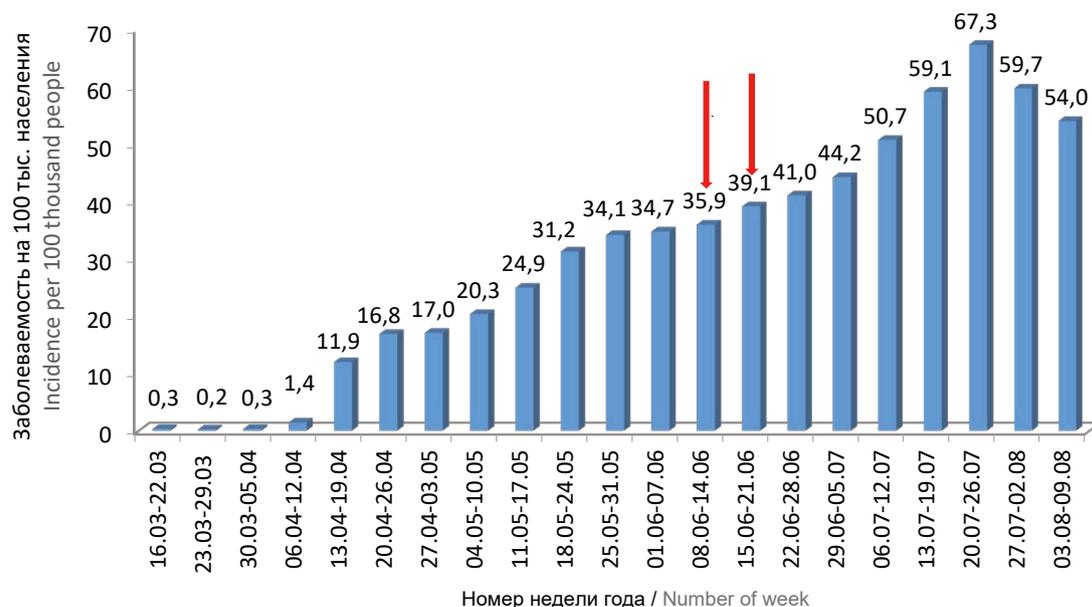


Рис. 1. Заболеемость COVID-19 в Хабаровском крае в 2020 г.

Стрелки — начало и окончание периода взятия проб крови для определения специфических антител к SARS-CoV-2 (09–16.06.2020).

Fig. 1. The incidence of COVID-19 in the Khabarovsk Krai in 2020.

Arrows mark the beginning and the end of the blood sampling period for the determination of specific antibodies to SARS-CoV-2 (09–16.06.2020).

В период проведения исследования серопревалентности к вирусу SARS-CoV-2 показатели варьировали от 35,9 (95% доверительный интервал (ДИ) 32,7–39,3) до 39,1 (95% ДИ 35,8–42,7) на 100 тыс. населения. В последующие 5 нед отмечалось увеличение числа случаев, максимального уровня — заболеемость достигла 20 июля 2020 г. В первой декаде августа установлено статистически значимое снижение заболеемости. Исследование популяционного иммунитета было проведено с 9 по 21 июня 2020 г. в период нарастания интенсивности эпидемии COVID-19.

Географическое расположение Хабаровского края представляет интерес в связи с тем, что на юго-востоке по реке Усури он имеет границу с территорией КНР (провинция Хейлунцзян). Это представляется существенным эпидемиологическим фактором, обуславливающим трансграничную миграцию и реальную вероятность завоза инфекции.

Формирование популяционного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 приобретает особое значение для контроля эпидемиологической обстановки и планирования комплекса мероприятий по специфической и неспецифической профилактике COVID-19 [2]. Отсюда следует, что наличие широкой иммунной прослойки будет предпосылкой эффективного снижения скорости распространения инфекции.

Уровень популяционного иммунитета населения определяет вероятность распространения и

тяжесть течения любого массового инфекционного заболевания [3, 4]. В наивной популяции патогенный возбудитель, вызвавший эпидемическую вспышку, может неконтролируемо циркулировать, вызывая манифестные формы инфекции [5]. Если патоген обладает высокой контагиозностью, как, например, возбудители острых респираторных вирусных инфекций, в том числе SARS-CoV-2, то заболевание приобретает эпидемический характер и может существовать до того момента, пока число серопозитивных лиц не превысит число серонегативных. Применительно к COVID-19 считается, что этот порог составляет 60–70% вовлеченных в эпидемический процесс [6]. Вместе с тем эпидемический порог не является величиной застывшей и может изменяться в зависимости от конкретных условий жизнедеятельности, климатогеографических условий, интенсивности миграции населения, степени развития туризма и др.

Целью сероэпидемиологического исследования было определение уровня и структуры популяционного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 среди населения Хабаровского края в период интенсивного распространения COVID-19.

Материалы и методы

Работа проводилась в рамках первого этапа широкомасштабной программы Роспотребнадзора по оценке популяционного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 у населения России, разработанной с

учетом протокола, рекомендованного ВОЗ [2]. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера. Перед началом исследования все участники или их юридические представители были ознакомлены с целью, методикой исследования и подписали информированное согласие.

Отбор волонтеров для исследования проводили методом анкетирования и рандомизации путем случайной выборки. Критерием исключения была активная инфекция COVID-19 в момент анкетирования.

Объем выборки определяли по формуле:

$$n = \frac{t^2 \times p(1-p)}{m^2},$$

где:

n — объем выборки;

t — уровень точности (для 95% ДИ $t = 1,96$);

p — оценочная распространенность изучаемого явления (при 50% $p = 0,5$);

m — допустимая ошибка 5% [7].

Всего анкеты заполнили 7216 волонтеров, из них у 2688 человек отбирали пробы крови из вены для последующего исследования на наличие специфических антител к SARS-CoV-2. В анализ включены результаты обследования 2675 человек.

Возраст обследованных добровольцев варьировал от 1 года до 70 лет и старше (табл. 1).

Число волонтеров во всех возрастных группах было сопоставимым. Учитывая особенности детского возраста, первую группу разделили на три подгруппы: 1–6, 7–13 и 14–17 лет. Из всей когорты волонтеров доля лиц с наличием верифицированно-

го диагноза COVID-19 в анамнезе составила 2,1% ($n = 56$).

Пробы крови волонтеров отбирали в вакутейнеры с ЭДТА и центрифугировали. Плазму отделяли от клеточных элементов, переносили в пластиковые пробирки и хранили до исследования при 4°C. Содержание антител к SARS-CoV-2 определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием набора реагентов для анализа сыворотки или плазмы крови человека на наличие специфических иммуноглобулинов класса G (IgG) к нуклеокапсиду вируса SARS-CoV-2 (ФБУНГНЦ ПМБ Роспотребнадзора). Результаты учитывали качественным методом и считали положительными при превышении уровня cut-off [2].

Статистическую обработку проводили с использованием методов вариационной статистики с помощью статистического пакета Excel и программного продукта «WinPeri v.11.65»). Для оценки достоверности различий сравниваемых показателей использовали ДИ и уровень вероятности. Тенденция заболеваемости COVID-19 в Хабаровском крае рассчитана методом регрессионного анализа.

Результаты

Уровень серопревалентности среди населения Хабаровского края

Серопревалентность к SARS-CoV-2 среди жителей Хабаровского края во всей когорте обследованных составила 19,6%. По возрастным группам показатели серопревалентности варьировали в диапазоне от 14,7 до 34,4% (табл. 1). Максимальный уровень сероконверсии выявлен в детской возрастной группе (преимущественно за счет детей

Таблица 1. Серопревалентность к вирусу SARS-CoV-2 у жителей Хабаровского края разных возрастных групп
Table 1. Seroprevalence to SARS-CoV-2 virus in residents of the Khabarovsk Krai of different age groups

Возраст, лет Age, years	n	В том числе / Including:		Серопревалентность, % (95% ДИ) Seroprevalence, % (95% confidence interval)
		серопозитивных seropositive	серонегативных seronegative	
1–17	383	88	295	23,0 (18,9–27,5)
В том числе: Including:				
1–6	190	34	156	17,9 (12,7–24,1)
7–13	129	32	97	24,8 (17,6–33,2)
14–17	64	22	42	34,4 (22,9–47,3)
18–29	385	73	312	19,0 (15,2–23,2)
30–39	383	59	324	15,4 (11,9–19,4)
40–49	382	56	326	14,7 (11,3–18,6)
50–59	382	80	302	20,9 (16,9–25,4)
60–69	380	83	297	21,8 (17,8–26,3)
70 и более 70 and older	380	86	294	22,6 (18,5–27,2)
Итого Total	2675	525	2150	19,6 (18,1–21,2)

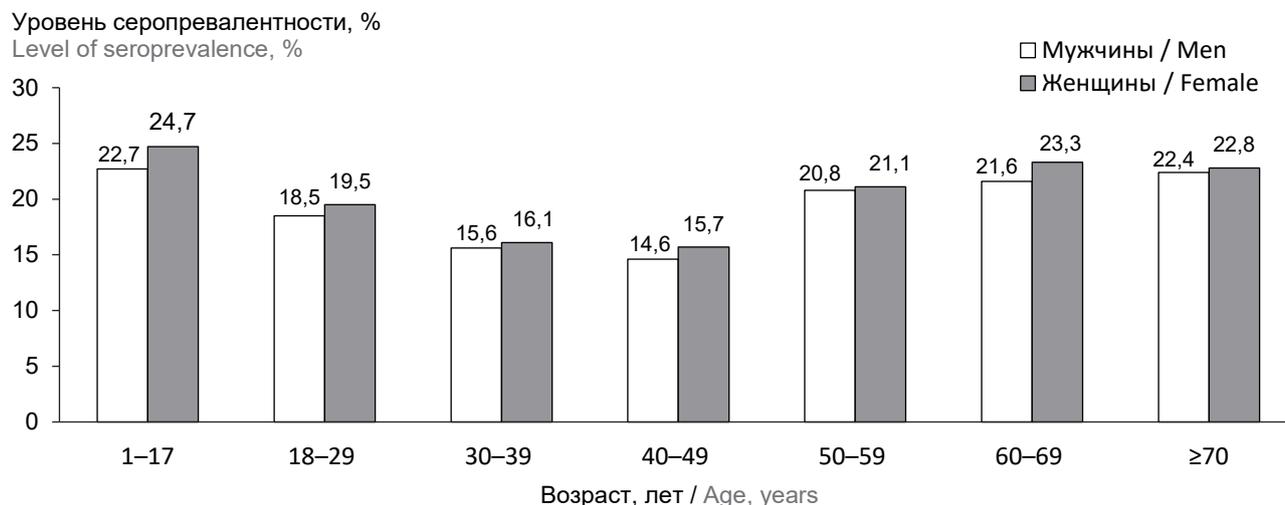


Рис. 2. Серопревалентность в различных возрастных группах мужского и женского населения Хабаровского края в 2020 г.

Различия между показателями мужчин и женщин статистически не значимы.

Fig. 2. Seroprevalence in different age groups of the male and female population of the Khabarovsk Krai in 2020.

The differences between the indicators of men and women are not statistically significant.

в возрасте 14–17 лет). В старшей возрастной группе (50 лет и старше) уровень серопревалентности существенно не отличался от таковой среди детей 1–17 лет. Обращает на себя внимание сравнительно низкий уровень сероконверсии у лиц 30–39 и 40–49 лет (рис. 1), различия с детской группой статистически значимы в возрасте 40–49 лет ($p < 0,05$).

При анализе гендерно-возрастного распределения серопревалентности установлено, что указанная выше тенденция характерна как для мужчин, так и для женщин (рис. 2).

При анализе районной структуры серопревалентности обращает на себя внимание значительная неравномерность выборки (табл. 2). Наиболь-

Таблица 2. Уровень серопревалентности и заболеваемости в районах Хабаровского края (по состоянию на 09.06.2020)

Table 2. Level of seroprevalence and morbidity in the districts of the Khabarovsk Krai (as of June 9, 2020)

Район District	Число зараженных Number of infected		Серопревалентность, % (95% ДИ) Seroprevalence, % (95% confidence interval)
	всего total	на 100 тыс. населения per 100,000 population	
г. Хабаровск / Khabarovsk	2102	341,02	19,7 (18,1–21,3)
г. Комсомольск-на-Амуре / Komsomolsk-on-Amur	75	30,64	10,0 (2,8–23,7)
Амурский / Amurskiy	10	17,2	*
Бикинский / Bikinskiy	18	81,01	*
Ванинский / Vaninsky	16	48,98	21,9 (9,3–39,9)
Вяземский / Vyazemsky	7	33,70	*
Николаевский / Nikolaevsky	7	27,33	*
Совгаванский / Sovgavansky	56	147,93	*
Хабаровский / Khabarovskiy	105	114,04	15,2 (6,3–28,9)
Ульчский / Ul'chskiy	157	1055,89	24,2 (16,2–33,9)
В целом по краю / In the whole territory	2661	202,26	19,6 (18,1–21,2)

Примечание. *В Амурском, Бикинском, Вяземском, Николаевском, Совгаванском районах в сумме обследованы 37 человек, из них 6 (16,2%) человек с положительным результатом на антитела.

Note. *In Amursky, Bikinsky, Vyazemsky, Nikolaevsky, Sovgavansky districts a total of 37 people were examined, including 6 (16.2%) people with a positive result for antibodies.

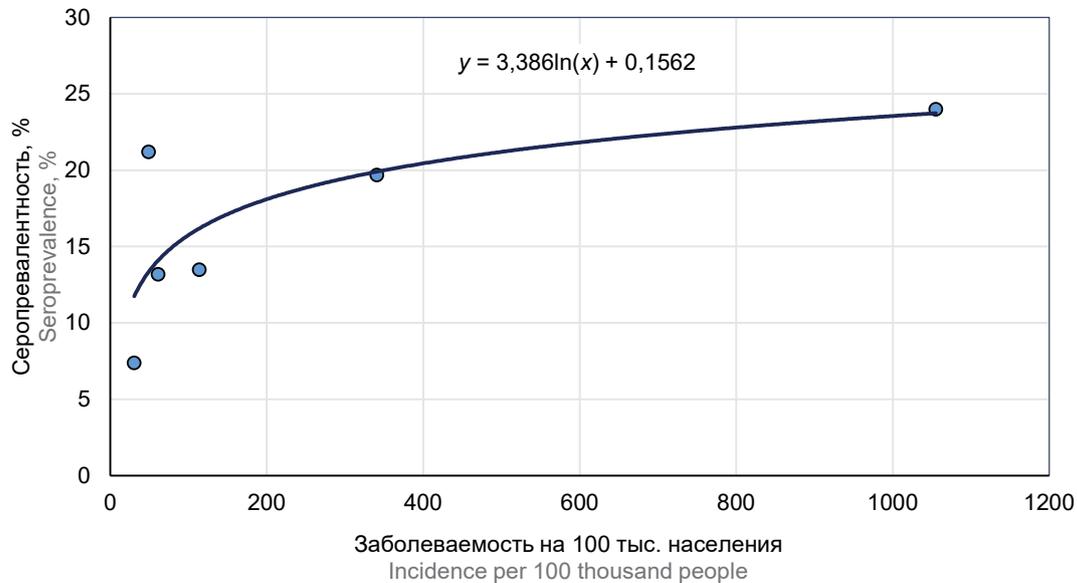


Рис. 3. Зависимость между серопревалентностью к SARS-CoV-2 и заболеваемостью COVID-19 среди волонтеров Хабаровского края.

Коэффициент корреляции (r_s) составил 0,66, пороговое значение r_{st} при $p < 0,05$ равно 0,7. Поскольку $r_s < r_{st}$, то достоверная корреляционная связь между сравниваемыми показателями не выявлена.

Fig. 3. The relationship between SARS-CoV-2 seroprevalence and COVID-19 morbidity among the volunteers of the Khabarovsk Krai.

The correlation coefficient (r_s) was 0.66 r_{st} threshold value at $p < 0.05$ is equal to 0.7. Since $r_s < r_{st}$, a significant correlation between compared indicators not identified.

шее число волонтеров (2421 человек; 90,5%) было обследовано в Хабаровске, в остальных регионах число обследованных составило 254 человека. Анализ имеющихся данных не показал каких-либо региональных особенностей серопревалентности в представленных районах. Можно лишь отметить некоторые колебания данного показателя. Так, наименьшая серопревалентность отмечена в Комсомольске-на-Амуре (10,0%), наибольшая — в Ульчском районе (24,2%). Вместе с тем объемы выборок оказались невелики, и можно предположить, что увеличение численности обследованных в районах могло дать более точные результаты, поскольку на максимальной выборке непосредственно в Хабаровске уровень серопревалентности составил 19,7%, что практически идентично среднепопуляционному показателю (19,6%).

Значительный интерес представляет сопоставление серопревалентности к вирусу SARS-CoV-2 и заболеваемости инфекцией COVID-19 в городах и районах Хабаровского края. Можно предположить, что между этими двумя показателями существует вероятностная связь: чем выше заболеваемость, тем выше риск инфицирования населения небольшими дозами возбудителя, которые не вызывают манифестную форму заболевания, но приводят к инаппарантной сероконверсии, проявляющейся в выработке адаптивного иммунного ответа, в том числе секретиции антител к вирусу SARS-CoV-2 [8].

Результаты исследования в Хабаровском крае показали, что наиболее высокий уровень заболеваемости (1055,89 на 100 тыс. населения) и серопревалентности (24,2%) отмечался в Ульчском районе (табл. 2). Второе место по заболеваемости занимал город Хабаровск (341,02 на 100 тыс.), показатель серопревалентности составил 19,7%.

При исследовании связи между уровнем заболеваемости и серопревалентности в районах Хабаровского края, описываемой уравнением $y = 3,386\ln(x) + 0,1562$, установлено, что указанная логарифмическая зависимость свидетельствует о наличии связи между сопоставляемыми показателями (рис. 3). Коэффициент корреляции $r = 0,66$ ($p = 0,1$) позволяет говорить только о тенденции процесса, что связано с небольшим количеством районов, в которых получены репрезентативные данные о серопревалентности к вирусу SARS-CoV-2.

Влияние факторов риска на уровень серопревалентности

Определенное влияние на уровень серопревалентности могут оказывать социально-профессиональные факторы, в частности сфера деятельности (табл. 4).

Представленные результаты согласуются с аналогичными данными по Ленинградской области с некоторыми отличиями [9]. Так, наиболее высокие уровни сероконверсии отмечены у работников образования, а также среди детей в возрасте 7–13 и

Таблица 4. Влияние социально-профессиональных факторов на уровень серопревалентности среди населения Хабаровского края

Table 4. Influence of social and professional factors on the level of seroprevalence among the population of the Khabarovsk Krai

Профессиональная деятельность Professional activity	n	В том числе / Including:		Серопревалентность, % (95% ДИ) Seroprevalence, % (95% confidence interval)
		серопозитивные seropositive	серонегативные seronegative	
Медицина Medicine	459	87	372	18,9 (15,5–22,8)
Бизнес Business	165	26	139	15,7 (10,6–22,2)
Образование Education	176	47	129	26,7 (22,3–33,9)
Военнослужащие Military personnel	218	19	199	8,7 (5,3–13,3)
Рабочие Workers	40	8	32	20,0 (9,1–35,7)
Силловые структуры Security Forces	201	45	156	22,4 (16,8–28,8)
Служащие Employees	391	69	322	17,6 (14,0–21,8)
Пенсионеры Retirees	558	126	432	22,6 (19,2–26,3)
Безработные Unemployed	96	8	88	8,3 (3,7–15,8)
Дети 1–17 лет Children 1–17 years old	383	88	295	23,0 (18,7–27,5)

14–17 лет. Можно предположить, что такие результаты обусловлены совместным вовлечением в учебный процесс и связанными с этим более активными контактами между упомянутыми группами населения. Несколько неожиданным оказался невысокий уровень сероконверсии у военнослужащих. Этот факт нуждается в дополнительном исследовании, можно предположить, что он связан с известной изолированностью воинских коллективов. В других регионах России выявлен более высокий уровень сероконверсии среди безработных, однако в Хабаровском крае это не установлено.

Серопревалентность среди лиц, перенесших COVID-19 и имеющих положительную реакцию ПЦР РНК вируса SARS-CoV-2

Среди обследованных волонтеров 56 (2,1%) человек указали на перенесенную в анамнезе инфекцию COVID-19. В этой группе добровольцев IgG-антитела к SARS-CoV-2 встречались у 58,9% лиц практически в равной степени как среди женщин, так и среди мужчин. У волонтеров, не имевших в анамнезе перенесенной инфекции, антитела к SARS-CoV-2 обнаружены в 18,8% случаев. Различия статистически значимы ($p < 0,05$). Эти результаты согласуются с данными литературы о том, что в ИФА среди переболевших COVID-19 антитела к SARS-CoV-2 могут выявляться в 55% случаев и более [10].

Другим важным аспектом обсуждаемой проблемы является связь между серопревалентностью и обнаружением вирусной РНК. Согласно существующим представлениям, только одно определение РНК в ПЦР или IgG в ИФА может оказаться недостаточным для точной диагностики имеющегося COVID-19 [11]. Из числа волонтеров Хабаровского края, которые сообщили о положительной ПЦР на наличие РНК SARS-CoV-2, у 50% были выявлены специфические IgG-антитела, при этом среди лиц с отрицательными результатами ПЦР специфические антитела обнаружены только у 26,4% волонтеров. Гендерных различий в обеих группах не выявлено. Оценить значимость полученных результатов не представляется возможным, поскольку неизвестен интервал между постановкой ПЦР и определением IgG-антител к SARS-CoV-2.

На вопрос анкеты о наличии или отсутствии контактов с больными COVID-19 ответили 2674 человека, из них 314 (11,7%) — положительно. В эту группу вошли 84 мужчины и 230 женщин. Соответственно, выборка лиц, не контактировавших с больными, включала 2360 человек (777 мужчин и 1583 женщины).

В результате серодиагностики в когорте волонтеров, имевших контакт с больными COVID-19, доля серопозитивных лиц составила 25,8% (табл. 5). Показатели серопревалентности среди мужчин и

женщин в этой группе существенно не различались. Среди волонтеров, не имевших контакта с больными, доля серопозитивных лиц была 18,8%, различия статистически значимы ($p < 0,05$).

Для лиц, инфицированных SARS-CoV-2, характерным признаком является высокая частота бессимптомных форм инфекции [12, 13]. При исследовании феномена серопревалентности среди волонтеров Хабаровского края расчет бессимптомных форм проводили следующим образом: из числа серопозитивных лиц вычитали тех, в анамнезе которых не было указано наличие диагноза COVID-19 и/или положительного результата ПЦР. В связи с критериями включения лица с признаками ОРЗ исключались на первом этапе (выбор волонтеров для сдачи крови).

В результате проведенного исследования выявлен высокий уровень бессимптомных форм среди

серопозитивных волонтеров (табл. 6). Наименьшая доля лиц с бессимптомным течением COVID-19 отмечена среди лиц возрастной группы 50–59 лет (88,8%), при этом в целом по Хабаровскому краю этот показатель составил 93,7%, причем в остальных возрастных группах он варьировал в пределах 91,5–98,2%. Анализ достоверности различий показал, что имеющаяся дисперсия невелика и статистически не значима ($p > 0,05$).

Обсуждение

В результате сероэпидемиологического исследования в Хабаровском крае установлено, что общая серопозитивность на IgG-антитела к SARS-CoV-2 в период нарастания интенсивности эпидемического процесса COVID-19 составила 19,6%. Этот показатель существенно не отличается от уровня серо-

Таблица 5. Наличие антител к SARS-CoV-2 в сыворотке крови в зависимости от анамнестического контакта с больными COVID-19 в Хабаровском крае

Table 5. Presence of antibodies to SARS-CoV-2 in blood serum, depending on the history of contact with patients with COVID-19 in the Khabarovsk Krai

Наличие контакта у волонтеров с больными COVID-19 Volunteers have contact with COVID-19 patients	n	В том числе / Including:		Серопревалентность, % (95% ДИ) Seroprevalence, % (95% confidence interval)
		серопозитивные seropositive	серонегативные seronegative	
Имели контакт Had contact	314	81	233	25,8 (21,1–31,0)
Не имели контакта Did not have contact	2360	440	1920	18,6 (17,1–20,3)
Мужчины, имевшие контакт Men who had contact	84	24	60	28,6 (19,2–39,5)
Мужчины, не имевшие контакта Men who did not have contact	777	138	639	17,8 (15,1–20,6)
Женщины, имевшие контакт Women who had contact	230	57	173	24,8 (19,3–30,9)
Женщины, не имевшие контакта Women who did not have contact	1583	302	1281	19,1 (17,2–21,1)

Таблица 6. Доля лиц с бессимптомным течением COVID-19, в том числе в различных возрастных группах, в Хабаровском крае в июне 2020 г.

Table 6. The proportion of people with asymptomatic COVID-19 in different age groups in the Khabarovsk Krai in June 2020

Возрастная группа, лет Age, years	Выявлено серопозитивных, человек Identified seropositive, individuals	Из них были бессимптомными Of them were asymptomatic	
		n	% (95% ДИ) % (95% confidence interval)
1–17	88	83	94,3 (87,2–98,1)
18–29	73	70	95,9 (88,5–99,1)
30–39	59	54	91,5 (81,3–97,2)
40–49	56	55	98,2 (90,5–99,9)
50–59	80	71	88,8 (79,7–94,7)
60–69	83	78	94,0 (86,5–98,1)
70 и старше / 70 and older	86	81	94,2 (86,9–98,1)
Всего / Total	525	492	93,7 (91,3–95,6)

превалентности в Ленинградской области (20,7%). Результаты тестирования дают основание полагать, что в настоящий период времени, независимо от пола, риск заражения COVID-19 наиболее высок для населения активного, трудоспособного возраста, особенно в диапазоне 30–49 лет (уровень выявления антител в этой группе составил 14,7–15,4%).

К территориям наиболее высокого риска заражения вирусом SARS-CoV-2 предположительно можно отнести г. Комсомольск-на-Амуре, Хабаровский район и некоторые другие. Однако данный вывод требует дальнейшего изучения из-за малой выборки, полученной в ходе настоящего исследования для ряда административных образований.

Установлен высокий (93,7%) удельный вес бессимптомных форм COVID-19 среди лиц с наличием в сыворотке крови антител к возбудителю SARS-CoV-2. Также отмечается относительно низкая стойкость выработанного иммунитета после перенесенной инфекции — лишь у 58,9% обследованных волонтеров были выявлены антитела. Аналогичные результаты получены и при оценке данных лиц с положительным анализом ПЦР в анамнезе (50,0%). Гендерных отличий в обеих группах не отмечено. Выявлена статистически значимая более высокая доля серопозитивных лиц среди контактировавших с больными COVID-19 по сравнению с волонтерами, не имевшими контакта, — 25,8 и 18,6% соответственно. Наименьший уровень серопревалентности установлен в группах безработных граждан и военнослужащих, наибольший — среди детей школьного возраста и подростков (7–13 и 14–17 лет), а также работников сферы образования.

Выводы

1. Коллективный иммунитет совокупного населения Хабаровского края составил 19,6%.
2. Максимальный уровень коллективного иммунитета установлен у детей 14–17 (34,4%) и 7–13 лет (24,8%), у взрослых старше 70 лет (22,6%).
3. Наибольший уровень серопозитивности, кроме детей и пожилых, выявлен среди работников образования (26,4%), силовых структур (22,45%), рабочих (20,0%) и работающих в сфере здравоохранения (18,9%).
4. Наименьший уровень серопозитивности выявлен у безработных (8,3%) и военных (8,7%).
5. Не установлено статистически значимых гендерных различий по уровню серопревалентности.
6. При наличии контактов с больными COVID-19 вероятность сероконверсии увеличивается в 1,4 раза.
7. Среди волонтеров, перенесших инфекцию COVID-19, антитела к вирусу SARS-CoV-2 выявлены в 58,9% случаев.

8. У лиц с позитивным результатом ПЦР-анализа, полученным ранее, антитела обнаружены в 50% случаев.
9. Доля бессимптомного течения инфекции среди серопозитивных волонтеров составила 93,7%.

Благодарность

Авторы выражают благодарность сотрудникам Хабаровского НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора Е.В. Негреевой, А.С. Плотниковой, М.М. Степашко, Т.А. Рыданской за помощь при организации и проведении исследования.

Acknowledgments

The authors are grateful to the staff of the Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rosпотребнадзор E.V. Negreeva, A.S. Plotnikova, M.M. Stepashko, T.A. Rydanskaya for help in organizing and conducting the study.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. ВОЗ. Выступление Генерального директора ВОЗ на пресс-брифинге по [коронавирусной инфекции 2019-nCoV, 11 февраля 2020 г.] Available at: <https://www.who.int/ru/dg/speeches/detail/who-director-general-s-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020>
2. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Башкетова Н.С., Фридман Р.К., Лялина Л.В. и др. Популяционный иммунитет к SARS-CoV-2 среди населения Санкт-Петербурга в период эпидемии COVID-19. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; (3): 124–130. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-124-130
3. Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology. Herd immunity; 2020. Available at: https://apic.org/monthly_alerts/herd-immunity/
4. Metcalf C.J.E., Ferrari M., Graham A.L., Grenfell B.T. Understanding herd immunity. *Trends Immunol.* 2015; 36(12): 753–55. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.10.004>
5. Gomes M.G.M., Corder R.M., King J.G., Langwig K.E., Souto-Maior C., Carneiro J., et al. Individual variation in susceptibility or exposure to SARS-CoV-2 lowers the herd immunity threshold. *medRxiv*. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.04.27.20081893>
6. Randolph H.E., Barreiro L.B. Herd immunity: understanding COVID-19. *Immunity*. 2020; 52(5): 737–41. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.04.012>
7. Newcombe R.G. Two-sided confidence intervals for the single proportion: comparison of seven methods. *Stat. Med.* 1998; 17(8): 857–87. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0258\(19980430\)17:8%3C857::aid-sim777%3E3.0.co;2-e](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0258(19980430)17:8%3C857::aid-sim777%3E3.0.co;2-e)
8. Lee C.Y.P., Lin R.T.P., Renia L., Ng L.F.P. Serological approaches for COVID-19: epidemiologic perspective on surveillance and control. *Front. Immunol.* 2020; 11: 879. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00879>
9. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Историк О.А., Мосевич О.С., Лялина Л.В. и др. Оценка популяционного иммунитета к SARS-CoV-2 среди населения Ленинградской области в период эпидемии COVID-19. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; (3): 114–123. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-114-123
10. Huang A.T., Garcia-Carreras B., Hitchings M.D.T., Yang B., Katzelnick L.C., Rattigan S.M., et al. A systematic review of antibody mediated immunity to coronaviruses: antibody kinetics,

correlates of protection, and association of antibody responses with severity of disease. *medRxiv*. 2020. Preprint.

<https://doi.org/10.1101/2020.04.14.20065771>

11. Krátká Z., Luxová S., Malíčková K., Fürst T., Šimková H. Testing for COVID-19: a few points to remember. *Čas. Lék. čes.* 2020; 159(2): 72–7.
12. Lai C.C., Liu Y.H., Wang C.Y., Wang Y.H., Hsueh S.C., Yen M.Y., et al. Asymptomatic carrier state, acute respiratory disease, and pneumonia due to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): Facts and myths. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2020; 53(3): 404–12. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.02.012>
13. Singhal T.A. Review of coronavirus disease-2019 (COVID-19). *Indian J. Pediatr.* 2020; 87(4): 281–6. <https://doi.org/10.1007/s12098-020-03263-6>

REFERENCES

1. WHO. WHO Director-General's remarks at the media briefing on 2019-nCoV on 11 February 2020. Available at: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020>
2. Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Mel'nikova A.A., Bashketova N.S., Fridman R.K., Lyalina L.V., et al. Herd immunity to SARS-CoV-2 among the population in Saint-Petersburg during the COVID-19 epidemic. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii*. 2020; 3: 124–130. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-124-130 (In Russian)
3. Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology. Herd immunity; 2020. Available at: https://apic.org/monthly_alerts/herd-immunity/
4. Metcalf C.J.E., Ferrari M., Graham A.L., Grenfell B.T. Understanding herd immunity. *Trends Immunol.* 2015; 36(12): 753–55. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.10.004>
5. Gomes M.G.M., Corder R.M., King J.G., Langwig K.E., Souto-Maior C., Carneiro J., et al. Individual variation in suscepti-

bility or exposure to SARS-CoV-2 lowers the herd immunity threshold. *medRxiv*. Preprint.

<https://doi.org/10.1101/2020.04.27.20081893>

6. Randolph H.E., Barreiro L.B. Herd immunity: understanding COVID-19. *Immunity*. 2020; 52(5): 737–41. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.04.012>
7. Newcombe R.G. Two-sided confidence intervals for the single proportion: comparison of seven methods. *Stat. Med.* 1998; 17(8): 857–87. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0258\(19980430\)17:8%3C857::aid-sim777%3E3.0.co;2-e](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0258(19980430)17:8%3C857::aid-sim777%3E3.0.co;2-e)
8. Lee C.Y.P., Lin R.T.P., Renia L., Ng L.F.P. Serological approaches for COVID-19: epidemiologic perspective on surveillance and control. *Front. Immunol.* 2020; 11: 879. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00879>
9. Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Mel'nikova A.A., Historik O.A., Mosevich O.S., Lyalina L.V., et al. Assessment of the herd immunity to SARS-CoV-2 among the population of the Leningrad Region during the COVID-19 Epidemic. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii*. 2020; 3: 114–123. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-114-123 (in Russian)
10. Huang A.T., Garcia-Carreras B., Hitchings M.D.T., Yang B., Katzelnick L.C., Rattigan S.M., et al. A systematic review of antibody mediated immunity to coronaviruses: antibody kinetics, correlates of protection, and association of antibody responses with severity of disease. *medRxiv*. 2020. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.04.14.20065771>
11. Krátká Z., Luxová S., Malíčková K., Fürst T., Šimková H. Testing for COVID-19: a few points to remember. *Čas. Lék. čes.* 2020; 159(2): 72–7.
12. Lai C.C., Liu Y.H., Wang C.Y., Wang Y.H., Hsueh S.C., Yen M.Y., et al. Asymptomatic carrier state, acute respiratory disease, and pneumonia due to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): Facts and myths. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2020; 53(3): 404–12. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.02.012>
13. Singhal T.A. Review of coronavirus disease-2019 (COVID-19). *Indian J. Pediatr.* 2020; 87(4): 281–6. <https://doi.org/10.1007/s12098-020-03263-6>

Информация об авторах

Попова Анна Юрьевна — д.м.н., проф., руководитель Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2567-9037>

Ежлова Елена Борисовна — к.м.н., зам. руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Россия, ezhlova_eb@gse.ru

Мельникова Альбина Андреевна — к.м.н., зам. начальника Управления эпидемиологического надзора Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5651-1331>

Троценко Ольга Евгеньевна — д.м.н., директор Хабаровского НИИ эпидемиологии и микробиологии, Хабаровск, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3050-4472>

Зайцева Татьяна Анатольевна — рук. Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Хабаровскому краю, Хабаровск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3531-4996>

Лялина Людмила Владимировна — д.м.н., проф., зав. лаб. эпидемиологии инфекционных и неинфекционных заболеваний НИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9921-3505>

Гарбуз Юрий Алексеевич — главный врач Центра гигиены и эпидемиологии в Хабаровском крае, Хабаровск, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8933-3474>

Смирнов Вячеслав Сергеевич — д.м.н., проф., в.н.с. НИИЭМ им. Пастера, 197101, Санкт-Петербург, Россия, vssmi@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2723-1496>

Information about the authors

Anna Yu. Popova — D. Sci. (Med.), Prof., Head, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2567-9037>

Elena B. Ezhlova — Cand. Sci. (Med.), Deputy Head, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow, Russia, ezhlova_eb@gse.ru

Albina A. Melnikova — Cand. Sci. (Med.), Deputy Head, Epidemiological surveillance department, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5651-1331>

Olga E. Trotsenko — D. Sci. (Med.), Director, Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3050-4472>

Tatiana A. Zaitseva — Head, Department of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare in the Khabarovsk Krai, Khabarovsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3531-4996>

Lyudmila V. Lyalina — D. Sci. (Med.), Prof., Head, Laboratory of epidemiology of infectious and non-infectious diseases, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9921-3505>

Yury A. Garbuz — Chief doctor, Center for Hygiene and Epidemiology in the Khabarovsk Krai, Khabarovsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8933-3474>

Vyacheslav S. Smirnov — D. Sci. (Med.), Prof., leading researcher, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2723-1496>

Ломоносова Валерия Игоревна — лаборант-исследователь лаб. эпидемиологии инфекционных и неинфекционных заболеваний НИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4531-2724>

Балахонцева Людмила Анатольевна — зав. центром по профилактике и борьбе со СПИДом Хабаровского НИИ эпидемиологии и микробиологии, Хабаровск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3209-7623>

Котова Валерия Олеговна — зав. лаб. эпидемиологии и профилактики вирусных гепатитов и СПИДа Хабаровского НИИ эпидемиологии и микробиологии, Хабаровск, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9824-7025>

Базыкина Елена Анатольевна — м.н.с. Хабаровского НИИ эпидемиологии и микробиологии, Хабаровск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5695-6752>

Бутакова Людмила Васильевна — н.с. Дальневосточного регионального научно-методического центра по изучению энтеровирусных инфекций Хабаровского НИИ эпидемиологии и микробиологии, Хабаровск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7238-3691>

Салега Елена Юрьевна — к.м.н., рук. Дальневосточного регионального научно-методического центра по изучению энтеровирусных инфекций Хабаровского НИИ эпидемиологии и микробиологии, Хабаровск, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4438-6913>

Алейникова Надежда Владимировна — м.н.с. Хабаровского НИИ эпидемиологии и микробиологии, Хабаровск, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1336-4260>

Бebenina Лариса Александровна — м.н.с. Хабаровского НИИ эпидемиологии и микробиологии, Хабаровск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8252-2165>

Лосева Светлана Михайловна — зам. рук. Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Хабаровскому краю, Хабаровск, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5375-2060>

Каравянская Татьяна Николаевна — начальник эпидемиологического отдела Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Хабаровскому краю, Хабаровск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8231-7559>

Тотолян Арег Артемович — д.м.н., проф., академик РАН, директор НИИЭИ им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4571-8799>

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

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

Статья поступила в редакцию 09.10.2020; принята к публикации 28.10.2020.

Valeria I. Lomonosova — research assistant, Laboratory of epidemiology of infectious and non-infectious diseases, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4531-2724>

Lyudmila A. Balakhontseva — Head, Center for the prevention and control of AIDS, Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3209-7623>

Valeria O. Kotova — Head, Laboratory of epidemiology and prevention of viral hepatitis and AIDS, Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9824-7025>

Elena A. Bazykina — junior researcher, Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5695-6752>

Lyudmila V. Butakova — researcher, Far Eastern regional scientific and methodological center for the study of enterovirus infections, Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7238-3691>

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

Nadezhda V. Aleinikova — junior researcher, Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1336-4260>

Larisa A. Bebenina — junior researcher, Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8252-2165>

Svetlana M. Loseva — Deputy Head, Department of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare in the Khabarovsk Krai, Khabarovsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5375-2060>

Tatiana N. Karavyanskaya — Head, Epidemiological department, Department of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare in the Khabarovsk Krai; Khabarovsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8231-7559>

Areg A. Totolian — D. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, Director, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4571-8799>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

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

The article was submitted 09.10.2020; accepted for publication 28.10.2020.

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-47>

Выявление мутаций лекарственной устойчивости вируса гепатита С у пациентов с неэффективной терапией препаратами прямого противовирусного действия

Валутите Д.Э.^{1✉}, Семенов А.В.¹⁻³, Останкова Ю.В.¹, Козлов К.В.⁴, Борисов А.Г.⁵, Назаров В.Д.², Тотолян А.А.^{1,2}

¹Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

²Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

³Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

⁴Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

⁵Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук, Красноярск, Россия

Аннотация

Актуальность. Появление препаратов прямого противовирусного действия (ПППД) стало большим достижением в лечении пациентов с хроническим гепатитом С. Однако выявляются случаи отсутствия ответа на лечение. В 5% случаев наиболее вероятной причиной вирусологического прорыва являются мутации устойчивости к ПППД в геноме вируса гепатита С.

Цель работы — выявить мутации лекарственной устойчивости вируса гепатита С у пациентов с неэффективной терапией ПППД.

Материалы и методы. Материалом исследования служили образцы плазмы крови 3 пациентов с подтвержденным диагнозом хронического гепатита С с вирусологической неэффективностью терапии ПППД. Генотип всех изолятов — 1b. Применяли метод определения мутаций лекарственной устойчивости на основе прямого секвенирования генов *NS3*, *NS5A*, *NS5B*, разработанный в НИИЭМ им. Пастера.

Результаты. Мутации лекарственной устойчивости были выявлены во всех случаях. Согласно базе данных Gepo2rhepo [hcv] 0.92, нуклеотидные замены были определены в разных генах вируса и, предположительно, обуславливали устойчивость или снижение чувствительности в отношении препаратов, как входящих в состав комбинированной терапии софосбувир + даклатасвир, так и отсутствующих в ней. Неэффективность терапии противовирусными препаратами у пациентов с хроническим гепатитом С обусловлена мутациями лекарственной устойчивости.

Выводы. Разработанный метод позволяет выявлять мутации лекарственной устойчивости в генах *NS3*, *NS5A*, *NS5B* при вирусологической неэффективности терапии ПППД.

Ключевые слова: вирус гепатита С, мутации лекарственной устойчивости, препараты прямого противовирусного действия

Для цитирования: Валутите Д.Э., Семенов А.В., Останкова Ю.В., Козлов К.В., Борисов А.Г., Назаров В.Д., Тотолян А.А. Выявление мутаций лекарственной устойчивости вируса гепатита С у пациентов с неэффективной терапией препаратами прямого противовирусного действия. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021; 98(1): 18–27.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-47>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-47>

Detection of drug resistance mutations of hepatitis C virus in patients with failure of the treatment with direct acting antivirals

Diana E. Valutite^{1✉}, Aleksandr V. Semenov¹⁻³, Yulia V. Ostankova¹, Konstantin V. Kozlov⁴, Aleksandr G. Borisov⁵, Vladimir D. Nazarov², Areg A. Totolian^{1,2}

¹Saint Petersburg Pasteur Institute, Saint Petersburg, Russia

²Pavlov Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia

³North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia

⁴S.M. Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia

⁵Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russia

Abstract

Background. The development of direct acting antivirals (DAAs) has spurred a revolution in treatment of patients with chronic hepatitis C. However, there are cases showing no response to treatment. In 5% of cases, the viral breakthrough is most likely caused by DAA resistance mutations in the hepatitis C virus genome.

The purpose of the study is to detect drug resistance mutations of hepatitis C virus in patients with DAA treatment failure.

Materials and methods. The study was performed on plasma samples from 3 patients diagnosed with chronic hepatitis C virus infection and demonstrating DAA virological treatment failure. All isolates had genotype 1b. Drug resistance mutations were detected by using direct sequencing of NS3, NS5A, and NS5B genome regions. The detection technique was developed at the Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology.

Results. Drug resistance mutations were detected in all cases. By using the Geno2pheno [hcv] 0.92 tool, nucleotide substitutions were detected in different viral genome regions and presumably caused resistance or decreased sensitivity to antivirals both present and absent in the sofosbuvir + daclatasvir combination therapy. Antiviral treatment failure in patients with chronic hepatitis C is caused by drug resistance mutations.

Conclusions. The developed technique is efficient for detection of drug resistance mutations in NS3, NS5A, and NS5B regions in cases of virological failure of DAA treatment.

Keywords: hepatitis C virus, drug resistance mutations, direct acting antivirals

For citation: Valutite D.E., Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Kozlov K.V., Borisov A.G., Nazarov V.D., Totolian A.A. Detection of drug resistance mutations of hepatitis C virus in patients with failure of the treatment with direct acting antivirals. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(1):18–27.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-47>

Введение

Вирус гепатита С (ВГС) является одной из наиболее частых причин хронического заболевания печени¹. После заражения ВГС манифестная инфекция развивается примерно в 20% случаев, а самопроизвольное выздоровление происходит у 15–45% пациентов в первые 6 мес. после заражения [1].

Отсутствие лечения и прогрессирование хронического процесса ведет к перерождению нормальной ткани печени в фиброзную, нарушению структуры паренхимы и в итоге приводит к фиброзу и циррозу печени в течение 25–30 лет. Как только заболевание прогрессирует до цирроза, риск развития гепатоцеллюлярной карциномы в течение года составляет 1–5% [2].

Длительное время стандартом лечения хронического гепатита С (ХГС) оставалась комбинированная терапия пегилированным интерфероном (еженедельные подкожные инъекции) с рибавирином (ежедневный пероральный прием) в течение 24–48 нед. Данное лечение обуславливало устойчивый вирусологический ответ (УВО) — не определяемую качественным анализом ПЦР вирусную нагрузку во время лечения, через 12 нед (УВО12) и 24 нед (УВО24) после него — у более чем 50% пациентов с генотипом ВГС 1 после 12 мес терапии и у более чем у 80% пациентов с генотипами ВГС 2 и 3 после 6 мес терапии [3].

Достижение успеха в виде полной эрадикации вируса может быть ограничено как по причине на-

личия терапевтически сложного генотипа ВГС, так и по ряду других причин. Частые побочные явления в виде гриппоподобного, астеновегетативного, неврологического синдромов, снижения массы тела, лейкопении, тромбоцитопении приводят к необходимости снижения дозы препарата, ввода специфической медикаментозной терапии, а иногда — отмены основной терапии. Также более эффективно поддаются лечению люди молодого возраста, женского пола, европеоидной расы, с низкой вирусной нагрузкой ВГС в плазме крови и низким предсуществующим уровнем фиброза [4]. Успех терапии препаратами интерферона с рибавирином в отношении пациентов с клинически выраженным циррозом печени составляет 21,5% для всех пациентов и 11,3% для пациентов с ВГС генотипа 1, что говорит о низкой эффективности лечения для данной когорты пациентов [5]. В случае отсутствия ответа на терапию пациентам была рекомендована длительная монотерапия интерфероном, что не приводило к эрадикации вируса, но снижало уровень аминотрансфераз в сыворотке крови [6].

Появление препаратов прямого противовирусного действия (ППВД) стало прорывом в лечении пациентов с ХГС. Благодаря появлению безинтерфероновых схем терапии значительно увеличилась частота достижения УВО (более 90%), сократилась продолжительность курса (до 12 нед.), снизилось число побочных явлений (наиболее распространенными среди них были головная боль и повышенная утомляемость), режим приема препарата стал более удобен для пациентов (возможность приема лекарственных средств перорально 1 раз

¹ ВОЗ. Гепатит С. Основные факты. Available at: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>

в сутки)². Также использование новых лекарственных средств позволило обеспечить лечение пациентам с циррозом печени и другими осложнениями и достигать высоких значений УВО, что при предшествующей схеме терапии было проблематично [7].

Геном ВГС кодирует 4 структурных белка (core, E1, E2, P7) и 6 неструктурных белков (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) [8, 9]. В отличие от препаратов интерферона, механизм действия которых связан с опосредованным влиянием на репликацию и формирование вирусных частиц, ПППД влияют непосредственно на вирус, тем самым нарушая его жизненный цикл.

На данный момент выделяют 4 группы препаратов, нацеленных на 3 вирусных неструктурных белка-мишени: ингибиторы NS3-протеазы, ингибиторы NS5A-репликативного комплекса, нуклеотидные и нуклеотидные ингибиторы NS5B РНК-полимеразы [10]. В 2011 г. были одобрены первые ПППД — ингибиторы NS3 протеазы теллапревир и боцепревир [11]. Тройная терапия пегилированным интерфероном с рибавирином и ингибитором NS3-протеазы на 25% повысила эффективность в отношении больных, инфицированных ВГС генотипа 1 и ранее не получавших лечение. Наряду с этим достижение УВО у пациентов с циррозом печени и пациентов, ранее не ответивших на лечение, было весьма низким [12].

В России в клиническую практику введено использование лекарственных средств из всех 4 групп ингибиторов. Основной стратегией терапии пациентов с ХГС стало применение комбинированных препаратов [13].

Одним из основных вариантов на сегодняшний день являются схемы терапии на основе пангенотипного препарата софосбувир [14]. Данные схемы оптимальны для пациентов с ВГС генотипов 1, 2 и 3, что актуально для России³. Тем не менее для части пациентов (около 5%) противовирусная терапия

оказывается неэффективной. Неудачи могут быть связаны с феноменом лекарственной устойчивости вируса к противовирусным препаратам [15]. По некоторым данным, в 83% случаев неудачного исхода терапии обнаруживались одна или несколько мутаций резистентности в участках генома, кодирующих белки-мишени для действия ПППД [16, 17].

Возникновение устойчивости вируса связано с наличием нуклеотидных замен, появляющихся случайно в генах *NS3*, *NS5A*, *NS5B* ВГС при каждом цикле репликации. Некоторые замены препятствуют связыванию молекул препарата с их белковыми мишенями, тем самым делая вирус резистентным к данному препарату. Такие замены называются заменами, связанными с резистентностью. Большинство подобных мутаций в геноме нарушают способность вируса дикого типа выживать и размножаться в обычных условиях, но в условиях приема ПППД мутантные штаммы имеют преимущество перед вирусом дикого типа [18]. Важное значение имеют возможность обнаружения таких мутаций после неудачного лечения и наличие их у наивных в отношении терапии пациентов.

На данный момент в России и европейских странах не существует рутинного теста для определения мутаций лекарственной устойчивости ВГС к ПППД. Тем не менее его разработка проводится во многих странах, в том числе в России [19]. Согласно рекомендациям Европейской ассоциации по изучению печени по лечению гепатита С (2018) при наличии доступа у специалиста к надежным тестам на резистентность возможно использование полученных результатов анализа для принятия решения и определения дальнейшей тактики терапии как при планировании начала лечения, так и после рецидива [15].

Цель работы — выявить мутации лекарственной устойчивости ВГС у пациентов с неэффективной терапией ПППД.

Материалы и методы

В работе были использованы образцы плазмы крови от 3 пациентов с ХГС, не ответивших на лечение комбинированным препаратом софосбувир + даклатасвир. Образцы были предоставлены клиникой инфекционных болезней Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова (Санкт-Петербург, Россия) и больницей Красноярского научного центра СО РАН в 2018 г. У всех пациентов была выявлена вирусологическая неэффективность терапии.

Настоящее исследование выполнено в 2018–2019 гг. в лаборатории иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции НИИЭМ им. Пастера. На проведение данного исследования было получено согласие локального этического комитета. Все обследованные дали письменное информированное согласие на участие в исследовании.

² Государственный реестр лекарственных средств. Инструкция к медицинскому применению препарата симепревир. Available at: http://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=17e9ef63-ea93-4c5a-8cc3-0e83bead0b61&t; Государственный реестр лекарственных средств. Инструкция к медицинскому применению препарата нарлапревир. Available at: http://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=f60ec227-9db2-4c73-9b6a-fd1694cf11d6&t; Государственный реестр лекарственных средств. Инструкция к медицинскому применению препарата даклатасвир. Available at: http://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=de1dd06c-e526-4e30-b8d8-794c2ade02f9&t; Государственный реестр лекарственных средств. Инструкция к медицинскому применению препарата софосбувир. Available at: http://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=354729ed-4d65-4c32-9af1-4799a7104d2c&t

³ WHO. Guidelines for the care and treatment of persons diagnosed with chronic hepatitis C virus infection 2018. Key facts. Available at: <https://www.who.int/hepatitis/publications/hepatitis-c-guidelines-2018/>

Данные пациентов

Patients data

Данные Data	Пациент 1 Patient 1	Пациент 2 Patient 2	Пациент 3 Patient 3
Возраст, годы Age, years	43	55	55
Пол Sex	Мужской Male	Мужской Male	Мужской Male
Аланинаминотрансфераза, ЕД/л ALT, U/liter	190	66	131,1
Общий билирубин, мкмоль/л Total bilirubin, μmol/liter	29,5	5,9	7,7
Стадия фиброза (METAVIR) Fibrosis stage (METAVIR)	F1	F1	F2
Вирусная нагрузка до лечения, копий/мл Viral load before treatment, copies/ml	$2,1 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$
Генотип Genotype	1b	1b	1b
Схема лечения Treatment regimen	Софосбувир + даклатасвир SOF+DAC	Софосбувир + даклатасвир SOF+DAC	Софосбувир + даклатасвир SOF+DAC

Для всех пациентов были определены биохимические показатели, стадия фиброза по классификации METAVIR, вирусная нагрузка и выполнено генотипирование вируса. Данные представлены в **таблице**.

Согласно Единым европейским рекомендациям всем пациентам была назначена терапия комбинированным препаратом софосбувир, 400 мг + даклатасвир, 60 мг, 1 таблетка 1 раз в день после еды [15].

Для мониторинга эффективности лечения и оценки УВО12 и УВО24 проведено измерение вирусной нагрузки через 12 и 24 нед. от начала терапии. Во время скрининга через 12 нед. после начала приема препаратов у пациента 1 вирусная нагрузка с помощью высокочувствительных тестов не детектировалась. При скрининге через 24 нед. вирусная нагрузка составила $1,1 \times 10^6$ копий/мл. Во время скрининга через 12 нед. после начала приема препаратов для пациентов 2 и 3 вирусная нагрузка составила $3,2 \times 10^5$ и $4,2 \times 10^5$ копий/мл соответственно.

На первом этапе анализа проводили определение вирусной нагрузки и генотипа вируса с использованием наборов реагентов «АмплиСенс HCV-монитор-FL» и «АмплиСенс HCV-генотип-FL» соответственно. Далее была получена РНК из плазмы крови с использованием набора реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ЦНИИ эпидемиологии, Москва).

На следующем этапе проводили постановку обратной транскрипции набором реагентов для получения кДНК на матрице РНК «РЕВЕРТА-L» (ЦНИИ эпидемиологии, Москва).

Специфические праймеры для каждого генотипа были использованы с целью получения последовательностей

трех регионов вируса, мутации в которых ассоциированы с резистентностью, — *NS3*, *NS5A*, *NS5B*. Продукты амплификации были очищены и оценены на предмет длины и концентрации фрагментов. Нуклеотидные последовательности определяли с использованием генетического анализатора «ABI Prism 3500» («Applied Biosystems»). Первичный анализ полученных консенсусных нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы NCBI BLAST в сравнении с нуклеотидными последовательностями, представленными в международной базе данных GenBank. Фрагменты регионов *NS3*, *NS5A*, *NS5B* оценивали на наличие нуклеотидных замен, приводящих к мутациям лекарственной устойчивости, с помощью программы Geno2pheno [resistance] 3.4⁴.

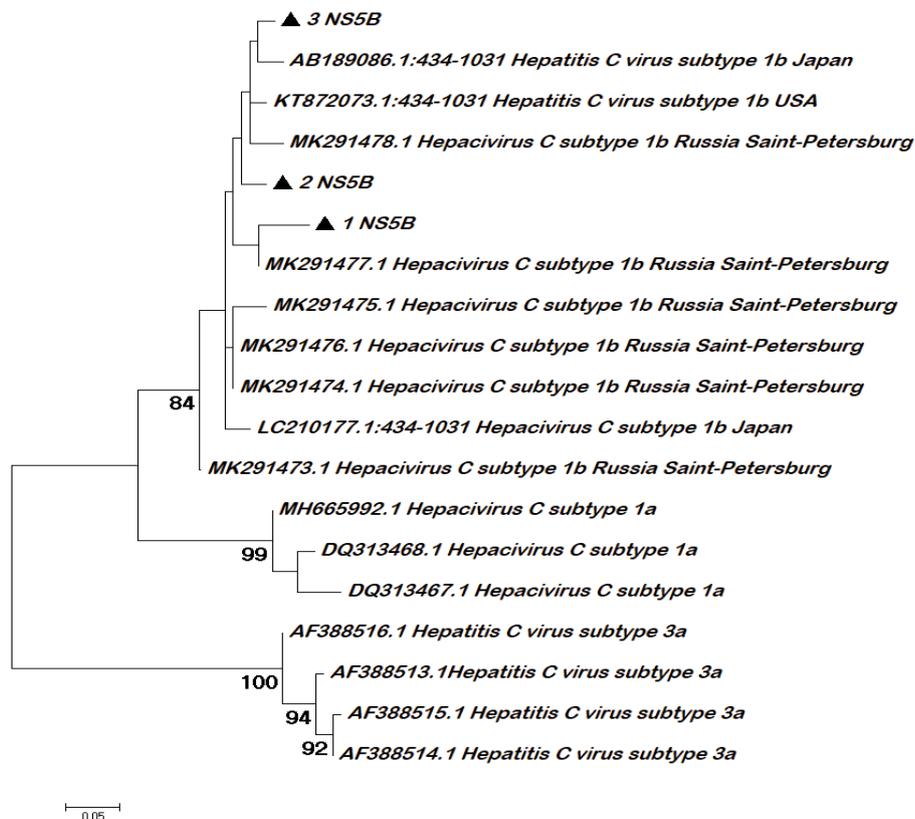
Результаты

Для всех 3 образцов с помощью прямого секвенирования были получены нуклеотидные последовательности целевых генов *NS3*, *NS5A*, *NS5B* удовлетворительного качества протяженностью 800, 750 и 600 п.н. соответственно.

Филогенетические отношения между исследованными образцами, полученными от пациентов с ХГС из России, и референсными последовательностями из международной базы данных GenBank представлены на **рисунке**. Для сравнения были выбраны нуклеотидные последовательности ВГС генотипов 1a, 1b, 3a.

Из анализа дендрограммы следует, что последовательности гена *NS5B* ВГС трех генотипов

⁴ Geno2pheno [hcv] 0.92.
Available at: <https://hcv.geno2pheno.org/index.php>



Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *NS5B* ВГС, выделенных от пациентов с ХГС из России, в сравнении с представленными в международной базе данных GenBank референсными последовательностями.

Исследованные в настоящей работе образцы от пациентов с вирусологически неэффективной терапией ПППД обозначены треугольниками. Даны значения bootstrap $\geq 60\%$.

The phylogenetic analysis of nucleotide sequences of the HCV *NS5B* gene fragment from CHC patients in Russia as compared to the reference sequences available in the international GenBank database.

The samples collected from patients failing DAA treatment and examined in this study are marked with triangles. The bootstrap value is $\geq 60\%$.

кластеризуются отдельно друг от друга. Все три образца с вирусологической неэффективностью распределены на близлежащих ветвях дерева, относящихся к нуклеотидным последовательностям ВГС генотипа 1b, что соответствует ранее определенным с помощью коммерческой тест-системы генотипам.

При оценке мутаций лекарственной устойчивости у всех пациентов были выявлены следующие мутации резистентности к препаратам:

- пациент 1: обнаружена мутация *Y93H* в регионе *NS5A*, обуславливающая резистентность вируса в отношении препаратов даклатасвир, входящего в схему терапии, и элбасвир, ледипасвир, омбитасвир, велпатасвир, не входящих в нее;
- пациент 2: мутация *L31V* в регионе *NS5A* привела к снижению чувствительности в отношении препаратов даклатасвир и омбитасвир;
- пациент 3: как и у пациента 2, была обнаружена нуклеотидная замена *L31V* в регионе *NS5A*. Наряду с этим в регионах *NS5B* и *NS3* выявле-

ны мутации *L159F* и *Y56F* соответственно. Нуклеотидная замена *L159F* обуславливает снижение чувствительности в отношении препарата софосбувир. Нуклеотидная замена *Y56F* в регионе *NS3* является причиной снижения чувствительности к препарату grazoprevir.

Всем пациентам было назначено лечение комбинированным препаратом глекапревир (ингибитор *NS3*) + пибрентасвир (ингибитор *NS5A*), мутации к которым не были обнаружены. Пациенты 2 и 3 достигли УВО12 и УВО24 на данной схеме терапии. Пациент 1 принял решение не придерживаться рекомендаций и прекратить лечение.

Обсуждение

Терапия ХГС препаратами пегилированного интерферона с рибавирином не является абсолютно эффективным методом эрадикации вируса и вызывает ряд проблем. Решением некоторых из них стало появление группы препаратов прямого противовирусного действия. Софосбувир — ингибитор

РНК-зависимой РНК-полимеразы NS5B белка. Терапевтическая эффективность при софосбувир-содержащих схемах достигается более чем в 95% случаев [20]. Для софосбувира характерна пангенотипная высокая противовирусная активность, что делает его препаратом выбора для большинства пациентов. Даклатасвир — прямой ингибитор белка NS5A ВГС. В комбинации с софосбувиром достигается подавление вирусной репликации сразу двух регионов, что обеспечивает достижение терапевтической эффективности более чем у 90% пациентов [16].

Самыми актуальными являются комбинированные схемы ПППД, включающие ингибиторы NS5A. Согласно Единым европейским рекомендациям (2016) проведение анализа на резистентность вируса к ПППД до терапии целесообразно в случае, если схема лечения предполагает включение ингибиторов NS5A [21].

Несмотря на высокий барьер к резистентности, обусловленный комбинацией двух противовирусных препаратов, во всех трех случаях, неэффективность терапии в виде обнаружения РНК вируса в плазме крови во время лечения может свидетельствовать о развитии доминирования резистентного штамма над диким в процессе приема препаратов и, как следствие, возникновении устойчивости к назначенной схеме. Нельзя исключить возможность наличия мутаций резистентности уже циркулирующего в организме штамма ВГС у этих пациентов до начала лечения, что также может стать причиной отсутствия ответа на терапию противовирусными препаратами. Для пациентов 2 и 3 резонно предположить вероятность циркуляции штаммов вируса с наличием мутаций резистентности к ПППД до лечения, что может объяснить отсутствие ответа на противовирусную терапию и недостижение УВО12. Напротив, поскольку у пациента 1 был достигнут УВО12, можно предположить развитие доминирования резистентного штамма ВГС над диким во время приема терапии. Но для данного пациента также нельзя исключить возможность реинфицирования другим штаммом вируса. Таким образом, секвенирование генов ВГС, нуклеотидные замены в которых ассоциированы с резистентностью к ПППД, перед началом терапии позволяет определить мутации к лекарственным препаратам, планируемыми к назначению. Анализ нуклеотидных последовательностей позволяет избежать назначения неадекватной схемы лечения для пациентов, что также будет целесообразным для лечебного учреждения или отдельных пациентов в свете отсутствия необходимости смены схемы лечения. Кроме того, секвенирование ВГС до начала терапии дает возможность определить филогенетическую близость штаммов вируса в случае вирусологического прорыва, что позволит дифференцировать реинфекцию от рецидива заболевания на фоне терапии.

Штаммы ВГС с полиморфизмом *Y93H*, выявленным у больного 1, связаны с высоким уровнем резистентности и обнаруживаются у пациентов, не принимавших терапию с участием ингибиторов NS5A [22]. Штаммы с данной мутацией способны сохраняться в течение длительного времени даже после прекращения терапии ПППД. Более того, указанная нуклеотидная замена обеспечивает повышенную продукцию резистентных к ПППД вирусов, но связана с более высокой восприимчивостью к ингибиторам протеаз. Таким образом, для оптимального выбора стратегии лечения пациентов с ХГС должны быть описаны подробные характеристики вариантов ВГС с полиморфизмом *Y93H*.

После неудачной терапии препаратами 1-й линии целесообразно назначать пангенотипную схему 2-й линии. В России зарегистрированы препараты элбасвир⁵, ледипасвир⁶, омбитасвир⁷, велпатасвир⁸, которые входят в состав комбинированной пангенотипной терапии [22]. Нуклеотидная замена *Y93H* приводит к перекрестной лекарственной устойчивости в отношении вышеперечисленных препаратов. Таким образом, некоторые мутации, приводящие к перекрестной лекарственной устойчивости, могут обуславливать отсутствие успеха в лечении пациентов с ХГС при назначении как 1-й линии терапии, так и альтернативных вариантов лечения ПППД. В данном случае актуальными остаются проблемы фармакоэкономического характера в связи с необходимостью смены нескольких схем терапии и появлением осложнений вследствие отсутствия положительного воздействия препаратов.

Одиночная нуклеотидная замена *L31V* в регионе *NS5A* у пациентов 2 и 3 снижает чувствительность к некоторым ингибиторам. Однако комбинация мутаций *L31V* и *Q54L* может придавать устойчивость в отношении других ПППД [23].

В клиническом исследовании P7977-2025 для 16 (26%) пациентов из 61 после трансплантации печени не наблюдали ответ на терапию софосбувир + рибавирин. Шесть (37,5%) пациентов из 16 не достигли УВО12, и, что характерно, у вируса детекти-

⁵ Государственный реестр лекарственных средств. Инструкция к медицинскому применению препарата элбасвир. Available at: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=4d2ccc52-e4e9-4349-acc8-73f0c84d52c3&t

⁶ Государственный реестр лекарственных средств. Инструкция к медицинскому применению препарата ледипасвир. Available at: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=74291100-1f06-4e05-9c49-a8ff0356170e&t

⁷ Государственный реестр лекарственных средств. Инструкция к медицинскому применению препарата омбитасвир. Available at: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=ad5159a1-91c1-42ec-aec6-e65d4e5313dd&t

⁸ Государственный реестр лекарственных средств. Инструкция к медицинскому применению препарата велпатасвир. Available at: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=c9275dea-5954-42ea-97c1-cd9ae05ccf6e&t

рована аминокислотная замена *C316N*. Для остальных 45 (74%) пациентов был достигнут УВО12 и не было характерно наличие замены *C316N* [24]. В клиническом исследовании NEUTRINO у 4 (6%) пациентов из 66 выявлены изоляты ВГС с мутацией *C316N* до начала лечения. Из них 50% не ответили на терапию софосбувир + рибавирин. Также в данном исследовании 85% пациентов со штаммом ВГС без мутации *C316N* достигли УВО12 [20, 25]. Таким образом, пациентам в состоянии после трансплантации, нуждающимся в терапии ПППД, целесообразно проводить анализ на резистентность ВГС к ПППД для исключения риска как вирусологического прорыва во время терапии, так и полного отсутствия ответа на нее.

Помимо мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью, в гене *NS3* у пациента 1 был выявлен один полиморфный вариант, у пациентов 2 и 3 — 6 и 7 соответственно. Важно отметить, что мутация *F147S* была обнаружена во всех 3 случаях, а мутации *S7A*, *A66G*, *K87A* — в 2 из 3.

В гене *NS5B* у пациента 1 были выявлены 6 полиморфных вариантов, а у пациентов 2 и 3 — 6 и 3 полиморфных варианта соответственно. Мутации *S231N* и *R254K* обнаружены в 2 из 3 случаев.

В гене *NS5A* у пациента 1 выявлены 7 полиморфных вариантов, у пациентов 2 и 3 — 15 и 12 соответственно. Важно отметить, что мутации *K6R*, *S17T*, *L34V*, *K44R* определялись во всех 3 случаях, а мутации *T64S*, *V164A*, *V174T*, *L183V* — у 2 из 3 пациентов.

Высокий полиморфизм генов характерен для всех РНК-вирусов, в том числе для ВГС. Тем не менее не до конца изучен вопрос о часто встречающихся полиморфных вариантах, которые могут быть причиной как снижения чувствительности, так и снижения устойчивости к тем или иным препаратам. Важность анализа естественных полиморфных паттернов заключена в потенциальной роли последних как мутаций лекарственной устойчивости вируса. В связи с появлением новых препаратов и новых схем терапии нельзя исключать часто встречающиеся нуклеотидные замены, ранее не ассоциированные с резистентностью как мутации лекарственной устойчивости. Статистические данные по результатам терапии ПППД продолжают обновляться, и не исключено, что снижение или отсутствие ответа на существующие препараты может быть связано с мутациями, которые на сегодняшний день не ассоциированы с лекарственной устойчивостью, или с появлением новых мутаций.

Несмотря на то что софосбувир-содержащие схемы отличаются наличием высокого барьера к формированию генетической резистентности, продолжают регистрироваться случаи срыва терапии по причине мутаций лекарственной устойчивости в одном или нескольких регионах вируса. Пробле-

ма отсутствия рутинного метода анализа ВГС на резистентность к противовирусным препаратам не только усугубляет проблему выбора оптимальной схемы терапии, но и затрагивает фармакоэкономические аспекты в связи с вынужденным назначением других схем лечения после неуспешной терапии препаратами 1-й линии. Данные клинические случаи подчеркивают необходимость проведения теста на наличие лекарственной устойчивости к назначаемым препаратам как в условиях вирусологического прорыва и вирусологической неэффективности, так и до назначения лечения.

Уровень устойчивости к тому или иному противовирусному препарату складывается из нескольких факторов: генетический барьер устойчивости к препарату; тип нуклеотидной замены в геноме вируса; частота, с которой замена, связанная с устойчивостью, присутствует в популяции вируса; наличие комбинаций нуклеотидных замен, которые присутствуют в популяции вируса. Эти факторы могут значительно повысить устойчивость к некоторым методам лечения [26]. Высокая частота мутаций и скорость репликации РНК-содержащих вирусов лежат в основе генетического разнообразия вирусного пула, персистирующего в организме отдельного индивида. Поэтому мутации, в том числе связанные с лекарственной устойчивостью, могут самопроизвольно генерироваться у каждого пациента. Следовательно, в пуле близкородственных вариантов вируса, называемом квазивидом, могут существовать в виде небольшой популяции лекарственно-устойчивые варианты до начала лечения противовирусными препаратами [27].

Метод секвенирования по Сэнгеру позволяет отчетливо выявить мажорный вариант вируса (квазивид), который доминирует в вирусной популяции исследуемой клинической пробы, но не выявляет минорные геномы присутствующих в пробе резистентных к лекарственным препаратам квазивидов, составляющих в популяции менее 15% от общего вирусного пула, в то время как секвенирование следующего поколения позволяет идентифицировать с максимальной достоверностью минорные мутации от 1–2% в популяции, выявить частоту, с которой каждая мутация присутствовала в вирусной популяции, и определить возможность объединения в одном вирусном геноме нескольких мутаций. Это может влиять как на терапевтическую эффективность, так и на дальнейшую тактику лечения [28]. Тем не менее прямое секвенирование является более доступным и экономически целесообразным, особенно при работе с отдельными пациентами в популяции, где уровень лекарственной устойчивости вируса к противовирусным препаратам невысок.

Секвенирование генов вируса позволит не только получать данные о наличии мутаций резистентности, но и анализировать эпидемиологиче-

скую ситуацию в стране и за ее пределами с помощью определения генотипов и субгенотипов вируса и выполнения филогенетического анализа [29].

Заключение

Разработка унифицированного теста на определение лекарственной устойчивости ВГС к ПППД остается актуальной задачей решения вопросов как назначения терапии, так и смены последней при необходимости.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Zabala V., Tong M., Yu R., Ramirez T., Yalcin E.B., Balbo S., et al. Potential contributions of the tobacco nicotine-derived nitrosamine ketone (NNK) in the pathogenesis of steatohepatitis in a chronic plus binge rat model of alcoholic liver disease. *Alcohol Alcohol*. 2015; 50(2): 118–31. <https://doi.org/10.1093/alcalk/agu083>
- Bertino G., Ardiri A., Proiti M., Rigano G., Frazzetto E., Demma S., et al. Chronic hepatitis C: This and the new era of treatment. *World J. Hepatol*. 2016; 8(2): 92–106. <https://doi.org/10.4254/wjh.v8.i2.92>
- Vogel W. Treatment of chronic hepatitis C patients not responding to combination therapy with ribavirin and interferon alpha — hype or hope? *Wien. Klin. Wochenschr*. 2004; 116(15–16): 508–10. <https://doi.org/10.1007/bf03217702>
- Strader D.B., Seeff L.B. A brief history of the treatment of viral hepatitis C. *Clin. Liver Dis. (Hoboken)*. 2012; 1(1): 6–11. <https://doi.org/10.1002/cld.1>
- Есметбетов К.И., Есметбетова Н.И. Противовирусная терапия цирроза печени в исходе хронического гепатита С препаратами интерферона. *Клиническая медицина Казахстана*. 2015; (4): 21–34.
- Koike K. Antiviral treatment of hepatitis C: present status and future prospects. *J. Infect. Chemother*. 2006; 12(5): 227–32. <https://doi.org/10.1007/s10156-006-0460-0>
- Ивашкин В.Т., Маевская М.В., Абдурахманов Д.Т., Бакулин И.Г., Гейвандова Н.И., Зубкин М.Л. и др. Современные возможности противовирусной терапии с использованием даклатасвира при лечении больных хроническим вирусным гепатитом С: результаты программы индивидуального доступа. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2017; 27(6): 52–62.
- Hijikata M., Kato N., Ootsuyama Y., Nakagawa M., Shimotohno K. Gene-mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by *in vitro* processing analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991; 88(13): 5547–51. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.13.5547>
- Lin C., Lindenbach B.D., Pragai B.M., Mccourt D.W., Rice C.M. Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and 2 distinct e2-specific products with different C termini. *J. Virol*. 1994; 68(8): 5063–73. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.8.5063-5073.1994>
- Aghemo A., De Francesco R. New horizons in hepatitis C antiviral therapy with direct-acting antivirals. *Hepatology*. 2013; 58(1): 428–38. <https://doi.org/10.1002/hep.26371>
- Sarrazin C., Kieffer T.L., Bartels D., Hanzelka B., Müh U., Welker M., et al. Dynamic hepatitis C virus genotypic and phenotypic changes in patients treated with the protease inhibitor telaprevir. *Gastroenterology*. 2007; 132(5): 1767–77. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.02.037>
- Lin C., Kwong A.D., Perni R.B. Discovery and development of VX950, a novel, covalent, and reversible inhibitor of hepatitis C virus NS3.4A serine protease. *Infect. Disord. Drug Targets*. 2006; 6(1): 3–16. <https://doi.org/10.2174/187152606776056706>
- Блохина Н.П., Малышев Н.А., Нурмухаметова Е.А. Лечение гепатита С: настоящее и будущее. *Туберкулез и значимые инфекции*. 2013; (1): 73–8.
- Бурневич Э.З., Никулкина Е.Н., Филатова А.Л. Софосбувир-содержащие схемы противовирусной терапии хронического гепатита С, актуальные в Российской Федерации в 2018 г. *Клиническая фармакология и терапия*. 2018; 27(2): 10–7.
- European Association for the Study of the Liver. EASL recommendations on treatment of hepatitis C 2018. *J. Hepatol*. 2018; 69(2): 461–511. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.026>
- Vermehren J., Susser S., Dietz J., Von Hahn T., Petersen J., et al. Retreatment of patients who failed DAA-combination therapies: real-world experience from a large hepatitis C resistance database. *Hepatology*. 2016; 64(2): 188.
- Кичатова В.С., Кюрегян К.К. Современный взгляд на резистентность к препаратам прямого противовирусного действия при лечении вирусного гепатита С. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2019; 8(2): 64–71. <https://doi.org/10.24411/2305-3496-2019-12009>
- Feld J.J. Resistance testing: Interpretation and incorporation into HCV treatment algorithms. *Clin. Liver Dis. (Hoboken)*. 2017; 9(5): 115–20. <https://doi.org/10.1002/cld.631>
- Валутите Д.Э. Апробация молекулярно-генетического метода выявления мутаций лекарственной устойчивости вируса гепатита С. В кн.: *Сборник тезисов VIII международного молодежного медицинского конгресса «Санкт-Петербургские научные чтения»*. СПб.; 2019: 180.
- Lawitz E., Mangia A., Wyles D., Rodriguez-Torres M., Hassanein T., Gordon S.C., et al. Sofosbuvir for previously untreated chronic hepatitis C infection. *N. Engl. J. Med*. 2013; 368(20): 1878–87. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1214853>
- European Association for the Study of the Liver. EASL recommendations on treatment of hepatitis C 2016. *J. Hepatol*. 2017; 66(1): 153–94. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.09.001>
- Nitta S., Asahina Y., Matsuda M., Yamada N., Sugiyama R., Masaki T., et al. Effects of resistance-associated NS5A mutations in hepatitis C virus on viral production and susceptibility to antiviral reagents. *Sci. Rep*. 2016; 6: 34652. <https://doi.org/10.1038/srep34652>
- Lemm J.A., O'Boyle D., Liu M., Nower P.T., Colonna R., Deshpande M.S., et al. Identification of hepatitis C virus NS5A inhibitors. *J. Virol*. 2010; 84(1): 482–91. <https://doi.org/10.1128/jvi.01360-09>
- Charlton M., Gane E., Manns M.P., Brown R.S., Curry M.P., Kwo P.Y., et al. Sofosbuvir and ribavirin for treatment of compensated recurrent hepatitis C virus infection after liver transplantation. *Gastroenterology*. 2015; 148(1): 108–17. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.10.001>
- Wang Y., Rao H.Y., Xie X.W., Wei L. Direct-acting antiviral agents resistance-associated polymorphisms in Chinese treatment-naïve patients infected with genotype 1b hepatitis C virus. *Chin. Med. J. (Engl)*. 2015; 128(19): 2625–31. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.166038>
- Amer F., Yousif M.M., Hammad N.M., Garcia-Cehic D., Gregori J., Rando-Segura A., et al. Deep-sequencing study of HCV G4a resistance-associated substitutions in Egyptian patients failing DAA treatment. *Infect. Drug Resist*. 2019; 12: 2799–807. <https://doi.org/10.2147/idr.s214735>
- Bellocchi M.C., Aragri M., Carioti L., Fabeni L., Pipitone R.M., Brancaccio G., et al. NS5A gene analysis by next generation sequencing in HCV nosocomial transmission clusters of HCV genotype 1b infected patients. *Cells*. 2019; 8(7): 666. <https://doi.org/10.3390/cells8070666>
- Georg von Massow G., Garcia-Cehic D., Gregori J., Rodriguez-Frias F., Macià M.D., Escarda A., et al. Whole-genome characterization and resistance-associated substitutions in a new HCV genotype 1 subtype. *Infect. Drug Resist*. 2019; 12: 947–55. <https://doi.org/10.2147/idr.s195441>

29. Семенов А.В., Останкова Ю.В., Герасимова В.В., Бичурина М.А., Козлов А.В., Мукомолов С.Л. и др. Молекулярно-эпидемиологические особенности изолятов вируса гепатита с из разных регионов Республики Саха (Якутия). *Инфекция и иммунитет*. 2015; 5(4): 359–72.

REFERENCES

1. Zabala V., Tong M., Yu R., Ramirez T., Yalcin E.B., Balbo S., et al. Potential contributions of the tobacco nicotine-derived nitrosamine ketone (NNK) in the pathogenesis of steatohepatitis in a chronic plus binge rat model of alcoholic liver disease. *Alcohol Alcohol*. 2015; 50(2): 118–31. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agu083>
2. Bertino G., Ardiri A., Proiti M., Rigano G., Frazzetto E., Demma S., et al. Chronic hepatitis C: This and the new era of treatment. *World J. Hepatol*. 2016; 8(2): 92–106. <https://doi.org/10.4254/wjh.v8.i2.92>
3. Vogel W. Treatment of chronic hepatitis C patients not responding to combination therapy with ribavirin and interferon alpha — hype or hope? *Wien. Klin. Wochenschr*. 2004; 116(15–16): 508–10. <https://doi.org/10.1007/bf03217702>
4. Strader D.B., Seeff L.B. A brief history of the treatment of viral hepatitis C. *Clin. Liver Dis. (Hoboken)*. 2012; 1(1): 6–11. <https://doi.org/10.1002/cld.1>
5. Esmembetov K.L., Esmembetova N.I. Antiviral therapy of liver cirrhosis due to chronic hepatitis C with interferon. *Klinicheskaya meditsina Kazakhstana*. 2015; (4): 21–34. (in Russian)
6. Koike K. Antiviral treatment of hepatitis C: present status and future prospects. *J. Infect. Chemother*. 2006; 12(5): 227–32. <https://doi.org/10.1007/s10156-006-0460-0>
7. Ivashkin V.T., Maevskaya M.V., Abdurakhmanov D.T., Bakulin I.G., Geyvandova N.I., Zubkin M.L., et al. The modern options of chronic hepatitis C antiviral therapy with daclatasvir: results of named patient program. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2017; 27(6): 52–62. (in Russian)
8. Hijikata M., Kato N., Ootsuyama Y., Nakagawa M., Shimotohno K. Gene-mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by *in vitro* processing analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991; 88(13): 5547–51. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.13.5547>
9. Lin C., Lindenbach B.D., Pragai B.M., Mccourt D.W., Rice C.M. Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and 2 distinct e2-specific products with different C termini. *J. Virol*. 1994; 68(8): 5063–73. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.8.5063-5073.1994>
10. Aghemo A., De Francesco R. New horizons in hepatitis C antiviral therapy with direct-acting antivirals. *Hepatology*. 2013; 58(1): 428–38. <https://doi.org/10.1002/hep.26371>
11. Sarrazin C., Kieffer T.L., Bartels D., Hanzelka B., Müh U., Welker M., et al. Dynamic hepatitis C virus genotypic and phenotypic changes in patients treated with the protease inhibitor telaprevir. *Gastroenterology*. 2007; 132(5): 1767–77. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.02.037>
12. Lin C., Kwong A.D., Perni R.B. Discovery and development of VX950, a novel, covalent, and reversible inhibitor of hepatitis C virus NS3A serine protease. *Infect. Disord. Drug Targets*. 2006; 6(1): 3–16. <https://doi.org/10.2174/187152606776056706>
13. Blokhina N.P., Malyshev N.A., Nurmukhametova E.A. Hepatitis C treatment: state-of-the-art and prospection. *Tuberkulez i znachimye infektsii*. 2013; (1): 73–8. (in Russian)
14. Burnevich E.Z., Nikulkina E.N., Filatova A.L. Sofosbuvir-based antiviral regimens for chronic hepatitis C in Russia. *Klinicheskaya farmakologiya i terapiya*. 2018; 27(2): 10–7. (in Russian)
15. European Association for the Study of the Liver. EASL recommendations on treatment of hepatitis C 2018. *J. Hepatol*. 2018; 69(2): 461–511. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.026>
16. Vermehren J., Susser S., Dietz J., Von Hahn T., Petersen J., et al. Retreatment of patients who failed DAA-combination therapies: real-world experience from a large hepatitis C resistance database. *Hepatology*. 2016; 64(2): 188.
17. Kichatova V.S., Kyuregyan K.K. Modern view on resistance to direct antiviral drugs in the treatment of viral hepatitis C: analytical review. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obucheniye*. 2019; 8(2): 64–71. <https://doi.org/10.24411/2305-3496-2019-12009> (in Russian)
18. Feld J.J. Resistance testing: Interpretation and incorporation into HCV treatment algorithms. *Clin. Liver Dis. (Hoboken)*. 2017; 9(5): 115–20. <https://doi.org/10.1002/cld.631>
19. Valutite D.E. Testing the molecular genetic method for detecting mutations in the drug resistance of hepatitis C virus. In: *Collection of Abstracts of the VIII International Youth Medical Congress «St. Petersburg Scientific Readings» [Sbornik tezisov VIII mezhdunarodnogo molodezhnogo meditsinskogo kongressa «Sankt-Peterburgskie nauchnye chteniya»]*. St. Petersburg; 2019: 180. (in Russian)
20. Lawitz E., Mangia A., Wyles D., Rodriguez-Torres M., Hassanein T., Gordon S.C., et al. Sofosbuvir for previously untreated chronic hepatitis C infection. *N. Engl. J. Med*. 2013; 368(20): 1878–87. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1214853>
21. European Association for the Study of the Liver. EASL recommendations on treatment of hepatitis C 2016. *J. Hepatol*. 2017; 66(1): 153–94. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.09.001>
22. Nitta S., Asahina Y., Matsuda M., Yamada N., Sugiyama R., Masaki T., et al. Effects of resistance-associated NS5A mutations in hepatitis C virus on viral production and susceptibility to antiviral reagents. *Sci. Rep*. 2016; 6: 34652. <https://doi.org/10.1038/srep34652>
23. Lemm J.A., O'Boyle D., Liu M., Nower P.T., Colonna R., Deshpande M.S., et al. Identification of hepatitis C virus NS5A inhibitors. *J. Virol*. 2010; 84(1): 482–91. <https://doi.org/10.1128/jvi.01360-09>
24. Charlton M., Gane E., Manns M.P., Brown R.S., Curry M.P., Kwo P.Y., et al. Sofosbuvir and ribavirin for treatment of compensated recurrent hepatitis C virus infection after liver transplantation. *Gastroenterology*. 2015; 148(1): 108–17. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.10.001>
25. Wang Y., Rao H.Y., Xie X.W., Wei L. Direct-acting antiviral agents resistance-associated polymorphisms in Chinese treatment-naïve patients infected with genotype 1b hepatitis C virus. *Chin. Med. J. (Engl)*. 2015; 128(19): 2625–31. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.166038>
26. Amer F., Yousif M.M., Hammad N.M., Garcia-Cehic D., Gregori J., Rando-Segura A., et al. Deep-sequencing study of HCV G4a resistance-associated substitutions in Egyptian patients failing DAA treatment. *Infect. Drug Resist*. 2019; 12: 2799–807. <https://doi.org/10.2147/idr.s214735>
27. Bellocchi M.C., Aragri M., Carioti L., Fabeni L., Pipitone R.M., Brancaccio G., et al. NS5A gene analysis by next generation sequencing in HCV nosocomial transmission clusters of HCV genotype 1b infected patients. *Cells*. 2019; 8(7): 666. <https://doi.org/10.3390/cells8070666>
28. Georg von Massow G., Garcia-Cehic D., Gregori J., Rodriguez-Frias F., Macià M.D., Escarda A., et al. Whole-genome characterization and resistance-associated substitutions in a new HCV genotype 1 subtype. *Infect. Drug Resist*. 2019; 12: 947–55. <https://doi.org/10.2147/idr.s195441>
29. Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Gerasimova V.V., Bichurina M.A., Kozlov A.V., Mukomolov S.L., et al. Molecular and epidemiological features of hepatitis C virus isolates from different regions of the Republic of Sakha (Yakutia). *Infektsiya i immunitet*. 2015; 5(4): 359–72. (in Russian)

Информация об авторах

Валутите Диана Эдуардовна[✉] — врач клинической лабораторной диагностики отделения ВИЧ-инфекции и СПИД-ассоциированных заболеваний НИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, dianaavalutite008@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-0931-102X>

Семенов Александр Владимирович — д.б.н., зав. лаб. иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции, зам. директора по инновационной работе НИИЭМ им. Пастера; доцент каф. иммунологии ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова; доцент каф. клинической лабораторной диагностики СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3223-8219>

Останкова Юлия Владимировна — к.б.н., с.н.с. лаб. молекулярной иммунологии НИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2270-8897>

Козлов Константин Вадимович — д.м.н., доц. каф. инфекционных болезней (с курсом медицинской паразитологии и тропических заболеваний) ВМА им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4398-7525>

Борисов Александр Геннадьевич — к.м.н., в.н.с. лаб. молекулярно-клеточной физиологии и патологии НИИ медицинских проблем Севера, Красноярск, Россия; доц. каф. инфекционных болезней КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9026-2615>

Назаров Владимир Дмитриевич — к.м.н., н.с. лаб. диагностики аутоиммунных заболеваний НМЦ молекулярной медицины ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9354-8790>

Тотолян Арег Артёмович — д.м.н., проф., акад. РАН, зав. лаб. молекулярной иммунологии, директор НИИЭМ им. Пастера; зав. каф. иммунологии ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4571-8799>

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

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

Статья поступила в редакцию 27.05.2020;
принята к публикации 28.10.2020; опубликована 25.02.2021.

Information about the authors

Diana E. Valutite[✉] — doctor of clinical laboratory diagnostics, Department for diagnosing HIV infection and AIDS-related diseases, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, dianaavalutite008@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-0931-102X>

Aleksandr V. Semenov — D. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of virology and immunology of HIV, Deputy director for innovation, St. Petersburg Pasteur Institute; Assoc. Prof., Department of immunology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University; Assoc. Prof., Department of clinical laboratory diagnostics, North-West State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3223-8219>

Yulia V. Ostankova — PhD (Biol.), senior researcher, Laboratory of molecular immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2270-8897>

Konstantin V. Kozlov — D. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Department of infectious diseases (with a course of medical parasitology and tropical diseases), S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4398-7525>

Aleksandr G. Borisov — PhD (Med.), leading researcher, Laboratory of molecular cell physiology and pathology, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russia; Assoc. Prof., Department of infectious diseases, Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9026-2615>

Vladimir D. Nazarov — PhD (Med.), research fellow, Laboratory of autoimmune diagnostics, Center for molecular medicine, Academician I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9354-8790>

Areg A. Totolian — D. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, Head, Laboratory of molecular immunology, Director, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia; Head, Department of immunology, Academician I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4571-8799>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

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

The article was submitted 27.05.2020;
accepted for publication 28.10.2020; published 25.02.2021.

Научная статья
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-53>



***Moraxella osloensis* в микробиоте репродуктивного тракта при бесплодии: случайные находки или маркеры патологии?**

Годовалов А.П.[✉], Карпунина Н.С., Карпунина Т.И.

Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера, Пермь, Россия

Аннотация

Цель работы — анализ возможной роли *Moraxella osloensis* в микробиоте генитального тракта мужчин и женщин при бесплодии.

Материалы и методы. Проведено исследование образцов содержимого уретры мужчин и отделяемого заднего свода влагалища женщин репродуктивного возраста, состоящих в бесплодном браке. Культуральное исследование осуществляли с использованием селективных питательных сред с последующей идентификацией культур по биохимическим свойствам. Метагеномное исследование 16S рибосомальной РНК образцов осуществлено на платформе «Illumina MiSeq».

Результаты. При метагеномном исследовании содержимого генитального тракта мужчин и женщин, состоящих в бесплодном браке, а также пациентов с диагнозом «острая генитальная гонококковая инфекция» в 100% образцов, зачастую в значительном количестве, зарегистрированы фрагменты генома *Moraxella spp.*, среди которых *M. osloensis* занимали лидирующие позиции. У женщин доля *M. osloensis* была в 2 раза больше, чем у мужчин ($25,3 \pm 9,0$ и $11,7 \pm 9,3\%$ соответственно). Показана высокая частота встречаемости ассоциаций *M. osloensis* с другими оппортунистическими патогенами, в частности *G. vaginalis* и *E. faecalis*. Представляется, что *M. osloensis* могут способствовать развитию и поддерживают бессимптомный воспалительный процесс. Более того, постоянное присутствие моракселл в микробиоте при гонококковой инфекции может указывать и на их определенную патогенетическую активность, и на синергичный характер взаимоотношений между *M. osloensis* и *N. gonorrhoeae*.

Заключение. Можно полагать, что именно *M. osloensis* формируют консорциумы, обуславливающие патосимбиоз в репродуктивных органах. Снижение фертильности на фоне асимптомного хронического воспаления при устойчиво сложившемся симбиозе, включающем моракселлы, предлагается рассматривать как индикаторное состояние для этой патологии, а *M. osloensis* — как её маркер.

Ключевые слова: исследование микробиома, 16S РНК секвенирование, *M. osloensis*, патосимбиоз, бесплодие, маркер

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Администрации Пермского края в рамках научного проекта 17-44-590404 p_a.

Для цитирования: Годовалов А.П., Карпунина Н.С., Карпунина Т.И. *Moraxella osloensis* в микробиоте репродуктивного тракта при бесплодии: случайные находки или маркеры патологии? *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2021; 98(1): 28–35.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-53>

Original article
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-53>

***Moraxella osloensis* as a part of genital tract microbiota in infertility: incidental findings or pathology markers?**

Anatoliy P. Godovalov[✉], Natalia S. Karpunina, Tamara I. Karpunina

E.A. Vagner Perm State Medical University, Perm, Russia

Abstract

Aim. To assess the potential role of *M. osloensis* in genital microbiota of infertile males and females..

Materials and methods. Samples from men's urethra and women's posterior vaginal fornix in barren couples of the reproductive age were examined. Cultivation was carried out using elective culture media with subsequent

identification of strains by biochemical properties. A metagenomic study of 16S ribosomal RNA samples was performed on the Illumina MiSeq platform using the MiSeq Reagent Kits v3 kit (600-Cycle Kit).

Results. Metagenomic study of samples from genital tracts of barren married couples, as well as from patients with suspected «acute genital gonococcal infection» demonstrated that all samples (100%) contained fragments of the *Moraxella* spp. genome, mostly in a huge amount, among which *M. osloensis* occupied leading positions. In women, the proportion of *M. osloensis* was twice as large as in men (25.3 ± 9.0 and $11.7 \pm 9.3\%$, respectively). A high frequency of association of *M. osloensis* with other opportunistic pathogens, *G. vaginalis* and *E. faecalis* in particular, was established. It appears that *M. osloensis* can contribute to development of asymptomatic inflammatory process. Moreover, the constant presence of moraxellas in the microbiota during gonococcal infection may indicate their certain pathogenetic activity, and the synergistic nature of the relationship between *M. osloensis* and *N. gonorrhoeae*.

Conclusion. We assume that it is *M. osloensis* that forms the consortia determining pathosymbiocenosis in the reproductive organs. In this context, we propose to consider a decrease in fertility with a steadily established symbiocenosis, including moraxella, as an indicative condition for this pathology, and *M. osloensis* as its marker.

Keywords: microbiome investigation, 16S RNA sequencing, *M. osloensis*, pathosymbiocenosis, infertility, marker

Funding. This research was supported by RFBR grant 17-44-590404 p_a and Administration of Perm region.

For citation: Godovalov A.P., Karpunina N.S., Karpunina T.I. *Moraxella osloensis* as a part of genital tract microbiota in infertility: incidental findings or pathology markers? *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(1):28–35.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-53>

Введение

Проблемой, которая в настоящее время подвергается всестороннему изучению, является влияние вагинальной микробиоты (ВМБ) на состояние здоровья женщин и их новорождённых [1]. Развитие представлений о состоянии вагинального биотопа женщин репродуктивного возраста неразрывно связано с историей изучения нормальной микрофлоры влагалища. В 1892 г. А. Додерлейн впервые описал бактерии, преобладавшие в нормоценозе, которые впоследствии назвали палочками Додерлейна, а в настоящее время объединяют под общим названием *Lactobacillus* spp. Дальнейшие исследования доказали, что нормальная флора весьма разнообразна и изменчива. Её состав зависит от множества факторов: возраста женщины, фазы менструального цикла, сексуальной активности, наличия беременности и др. Однако признаком здоровья по сей день считается преобладание в микробном пейзаже влагалища лактобацилл (до 95%). Здоровые женщины в основном колонизированы *L. crispatus*, *L. jensenii* и *L. iners*; однако и другие бактерии могут быть элементами ВМБ [2].

Параллельно с изучением нормальной микрофлоры исследовали и микробиоту женщин с патологическими выделениями. До недавнего прошлого все заболевания, не обусловленные гонококками, трихомонадами и кандидами, назывались «неспецифический вагинит/кольпит». Первое классическое клинико-эпидемиологическое исследование, с которым официально связано начало изучения бактериальных вагинозов, было проведено Н.Л. Gardner и соавт. в 1954 г. [3]. Авторы выделили новую бактерию из половых путей женщин, подтвердив её этиологическую значимость в развитии «неспецифических кольпитов» и возможность полового пути передачи. Лишь в 1980 г., ис-

пользуя метод ДНК-РНК-гибридизации, установили её принадлежность к совершенно новому роду *Gardnerella*, названному в честь Н.Л. Gardner. Соответственно, заболевание стали называть гарднереллезом. В 1982 г. Р.А. Totten и соавт. [4] доказали, что *G. vaginalis* всегда обнаруживаются у больных, но они встречаются также у 5–40% клинически здоровых женщин. Другими словами, гарднереллы не являются единственной причиной заболевания, более того, ведущая роль принадлежит консорциуму анаэробных бактерий.

В 1984 г. в Стокгольме по предложению научной группы К. Holmes было принято современное название болезни — бактериальный вагиноз (БВ) — как наиболее точно характеризующее патологию. Оказалось, что обсеменённость влагалища при БВ на несколько порядков выше, чем у здоровых женщин: 10^{10} – 10^{11} против 10^6 – 10^7 КОЕ/мл. При этом резко изменяется соотношение аэробной и анаэробной флоры в сторону увеличения последней и существенно меняется качественный состав микроорганизмов, прежде всего за счёт значительного уменьшения количества лактобацилл (до уровня менее 30% от исходного), их видового спектра и функциональной активности, сопровождающегося активизацией роста разнообразных условно-патогенных видов. Наряду с этим расширяется и перечень таксонов, ассоциированных с БВ. В их числе *Atopobium vaginae*, *Mobiluncus* spp., *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp. и другие анаэробные бактерии [5]. Термин «вагиноз» подчеркивает отсутствие воспалительной реакции со стороны слизистой влагалища, несмотря на обильные выделения с неприятным запахом, что подтверждается низким содержанием нейтрофильных лейкоцитов в вагинальном содержимом.

БВ — исключительно женское заболевание, между тем и у мужчин детектируются микроорга-

низмы, заселяющие влагалище женщин в подобных случаях. Поскольку никакие клинические симптомы при этом у них обычно не возникают, принято считать, что мужчины выступают лишь носителями инфекции и своего рода ее распространителями среди женщин. Появляются публикации, указывающие на влияние классических возбудителей БВ на сперму и семенную жидкость — два основных компонента, связанных с мужской фертильностью [6]. Однако при бактериологическом исследовании такие признанные ассоцианты микробиоты женщин при БВ, как *G. vaginalis* и *A. vaginae*, крайне редко детектируются в эякуляте мужчин. В подобных случаях диагностику провести удается лишь с помощью высокоточных лабораторных методов, а интерпретация полученных при этом результатов весьма сложна.

Внедрение не зависящих от культуры молекулярных методов предоставило новую информацию о бактериальном разнообразии в ВМБ, выявив большое количество привередливых и/или некультивируемых видов бактерий. Эти молекулярные исследования сформировали новый взгляд на роль состава бактериальных сообществ. Стало ясно, что их пейзаж гораздо сложнее, чем ранее признавалось, а в ВМБ в дополнение к уже идентифицированным видам обнаруживаются многие до сих пор неизвестные бактериальные таксоны [7, 8].

В литературе последних лет, характеризующей ВМБ на основе применения различных технологий микробиологического анализа, в том числе при БВ [9, 10], мы лишь однажды встретили указание на более или менее значимое представительство бактерий семейства *Moraxellaceae* [11]. Впервые описанные V. Могах [12], эти бактерии проявляли высокую степень тропизма к тканям глаза и сегодня относятся к ведущим этиопатогенам кератита, конъюнктивита и эндофтальмита [13]. Об их встречаемости и роли в генитальном тракте свидетельствуют немногочисленные публикации прошлых лет [14–18].

Наш опыт молекулярно-генетического исследования микрофлоры генитального тракта мужчин и женщин, состоящих в бесплодном браке, заставлял обращать внимание на присутствие генетических маркеров *Moraxella* spp., к тому же представителей этого рода мы всегда обнаруживали и в материале больных с предположительным диагнозом «острая генитальная гонококковая инфекция» (ОГГИ).

Цель исследования — оценить возможную диагностическую и прогностическую роль *Moraxella* spp., детектируемых в генитальном тракте пациентов, состоящих в бесплодном браке.

Материалы и методы

Для исследования использовали образцы вагинального содержимого, полученного из заднего свода влагалища с помощью мерной ложки Фолькмана

от 15 женщин, и пробы эякулята от 15 мужчин — их половых партнеров — при бесплодном браке, а также пробы отделяемого генитального тракта 12 пациентов с подозрением на ОГГИ.

Метагеномное исследование 16S рибосомальной РНК образцов осуществлено на платформе «Illumina MiSeq» с использованием набора «MiSeq Reagent Kits v3» («600-Cycle Kit») согласно рекомендациям производителя. Библиотеки для секвенирования участков V3–V4 гена 16S РНК были приготовлены согласно 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Illumina. При биоинформационной оценке применяли программное обеспечение для метагеномного анализа «Kraken Metagenomics v.2.0.0» (классификатор ридов — коротких нуклеотидных последовательностей), используя стандартную базу данных [19].

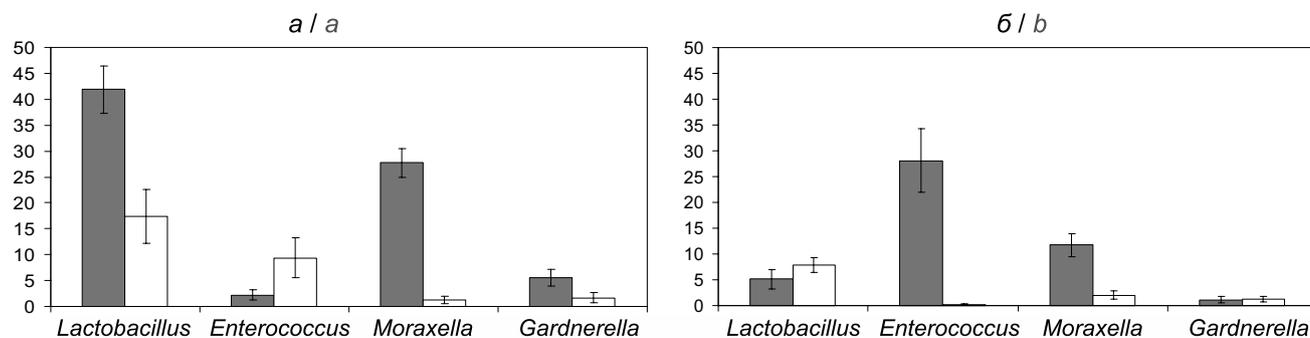
Для культурального метода применяли кровяной агар, среды Эндо и Сабуро, МРС, а также агар Мартена, изучали тинкториальные, культуральные и биохимические свойства выделенных штаммов.

Показатели количественных характеристик представлены как $M \pm \sigma$.

Результаты

При биоинформационной оценке полученных данных установлено высокое содержание фрагментов бактериальных геномов в образцах. Для вагинального биотопа — $83,9 \pm 16,1\%$, а для эякулята — $72,0 \pm 28,6\%$ от общего генетического материала в пробе.

Во влагалищной жидкости субфертильных женщин при метагеномном анализе доля бактерий семейства *Lactobacillaceae* составляла 12–84% ($41,9 \pm 17,99$; рисунок, а). В половине случаев содержание геномвариантов этого семейства не превышало 30% общей бактериальной массы, что характерно для БВ. Ведущее положение среди представителей семейства занимал род *Lactobacillus* с доминированием *L. jensenii*, *L. delbrueckii* и *L. amylolyticus*, однако генетические маркеры *L. crispatus* — индикатора нормоценоза — не выявлены, что также настораживает в плане дисбиотического состояния во влагалище обследованных. Генетический материал *L. iners* — бактерии скорее с негативной репутацией — практически не детектирован. В то же время удельное содержание анаэробных бактерий — типичных ассоциантов БВ: *Actinomyces* spp., *Peptoniphilus* spp., *Prevotella* spp., *Bacteroides* spp., *Fusobacterium* spp. и *Mobiluncus curtisii* — оказалось минимальным. *Enterococcus faecalis* детектированы во всех пробах, однако их удельный вес превышал 1% совокупного генетического материала лишь в трети случаев (рисунок, а). Доля микроорганизмов семейства *Staphylococcaceae* только в одном образце составила 0,5%, в остальных обнаруживали следовые количества, при этом преобладали гено-



Структура микрофлоры (показаны лидирующие таксоны) вагинального биотопа (а) и эякулята (б) при бесплодном браке (серые столбики) и ОГГИ (белые столбики).

The structure of microflora (leading taxa are shown) of the vaginal biotope (a) and ejaculate (b) in infertile marriage (gray bars) and acute genital gonococcal infection (white bars).

моварианты из рода *Staphylococcus*. Аналогично скудное представительство характерно и для семейства *Enterobacteriaceae*. Только в 2 случаях энтеробактерии в общей микробной массе составили 0,8%, хотя во всех пробах обнаружены фрагменты геномов *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. и комплекса *Enterobacter cloacae*.

В эякуляте мужчин — половых партнеров обследованных женщин во всех образцах детектировали *Enterococcus faecalis* — $28,1 \pm 23,6\%$ от общего количества генетического материала (рисунок, б). Кроме того, у всех мужчин обнаружены фрагменты генома представителей рода *Lactobacillus* и семейства *Enterobacteriaceae*, однако их более или менее значимое содержание ($\leq 5\%$) отмечали лишь в 1–2 образцах из 5. Удельный вес генетического материала бактерий — представителей родов *Prevotella*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Morganella*, *Corynebacterium* и *Staphylococcus*, которые встречались с заметным постоянством, был еще менее значительным.

Неожиданной находкой стало обнаружение во всех исследованных образцах в большом количестве генетических маркеров *Moraxella* spp. (рисунок), среди которых *M. osloensis* занимали лидирующие позиции. У женщин доля генетического материала *M. osloensis* оказалась в 2 раза больше, чем у мужчин ($25,3 \pm 9,0$ и $11,7 \pm 9,3\%$ соответственно).

Для вагинального биотопа субфертильных женщин установлено, что у половины из них *M. osloensis* присутствовали одновременно с *G. vaginalis*, при этом первый симбионт преобладал, а доля гарднерелл составляла порядка 10% общей бактериальной массы. В трети таких случаев присутствовали *E. faecalis* (8–15%). Кроме этого, *M. osloensis* чаще обнаруживали в пробах, когда среди лактобактерий лидировали представители *L. jensenii*. В 1 случае 20% генетического материала представлял геном *Bifidobacterium longum* в сочетании с *M. osloensis* (19%).

В эякуляте субфертильных мужчин детектирована устойчивая ассоциация *E. faecalis* и *M. osloensis*.

В трети проб доминирующее положение занимали *M. osloensis*, а более чем в половине — *E. faecalis*.

При сравнении с пробами, полученными от мужчин и женщин с предположительным диагнозом ОГГИ, установлено, что генетический материал *M. osloensis* в них только в 1 случае достигал 7% от общего содержания, а в остальных — не превышал 1%. Если сравнить встречаемость и содержание *M. osloensis* и *N. gonorrhoeae* в микробиоте, то в половине случаев генетический материал моракселл преобладал над таковым гонококков, только в каждом третьем образце фрагменты генома *N. gonorrhoeae* регистрировали чаще, чем *M. osloensis*. В остальных образцах эти два вида имели равный удельный вес.

При использовании культурального метода представители рода *Moraxella* не были выделены ни в одной пробе. При посевах образцов зачастую регистрировали один вид микроорганизмов, реже ассоциации 2 бактерий и менее чем в десятой доле проб — совокупность 3 микроорганизмов. При молекулярно-генетическом исследовании обнаружен значительно более широкий видовой спектр в каждой пробе. Примечательно, что те виды, которые высевали при культивировании, детектированы и при метагеномном исследовании, но в минимальных количествах, и наоборот, что трудно объяснить.

Обсуждение

При обследовании супружеских пар, состоящих в бесплодном браке, а также пациентов с типичной клинической картиной ОГГИ — признанной патологии, зачастую приводящей к infertility, — при молекулярно-генетическом изучении патологического материала нами во всех случаях обнаружены представители рода *Moraxella*. Важно подчеркнуть, что при применении бактериоскопического и культурального методов такие находки были единичными при бесплодии и не регистрировались при гнойно-воспалительном процессе.

Неудачи микроскопического исследования, скорее всего, связаны с особенностями биотопа. По данным [13], при инфицировании глаза, например, моракселлы могут быть достаточно успешно детектированы при использовании только микроскопического метода, поскольку являются грамотрицательными диплобациллами и их легко отличить от других немногочисленных таксонов в слезной жидкости. При исследовании отделяемого генитального тракта, где фигурирует широкий спектр бактериальных морфотипов, внешне сходных с моракселлами, такой подход не информативен. Более того, *M. osloensis* отчасти может удерживать кристаллический фиолетовый, что еще более затрудняет диагностический процесс. Идентификация моракселл по фенотипическим признакам при бактериологическом анализе также затруднительна: для культивирования требуются длительная инкубация (более 48 ч) и сложные условия (6% CO₂, многокомпонентные дорогостоящие, а порой недостаточно качественные среды и др.), при этом первоначальные колонии точечные, редко достигают 2 мм в диаметре [13]. Причинами неудач культурального метода, скорее всего, следует считать и предшествующее антагонистическое действие ассоциантов в биотопе, и бактерицидное влияние компонентов секретов и т.п. В то же время самые информативные метагеномные исследования не дают оснований судить о жизнеспособности и характере взаимоотношений между детектируемыми микроорганизмами [20]. Более того, описаны трудности интерпретации результатов такого анализа, поскольку между видами, например, рода *Neisseria* существует значительное сходство, достигающее в отдельных случаях 98–99% [21].

Наш первый опыт, констатирующий детекцию фрагментов генома моракселл в 100% исследованных образцов, в силу минимального объема наблюдений не может претендовать на сколько-нибудь категорическую оценку этого феномена. Однако он дает повод рассматривать представителей рода *Moraxella*, в первую очередь *M. osloensis*, в качестве возможных маркёров патологических изменений в микробиоте генитального тракта, ассоциированных с нарушением фертильности.

Наряду с установленной нами частотой их встречаемости в подобных случаях, основанием для такого предположения служат, на наш взгляд, и результаты ряда исследований других авторов, характеризующие биологические особенности этих бактерий. Исследователи указывают на высокую степень устойчивости моракселл к окислительному стрессу, который можно наблюдать в репродуктивном тракте в результате активности лейкоцитов и/или лактобактерий. Моракселлы, обладающие каталазной активностью, способны в большей степени выдерживать такой стресс, чем каталазанегативные

виды [22], а каталазная активность *M. osloensis* превышает таковую у *E. coli* [23].

Moraxella spp. широко распространены в окружающей среде, что обусловлено их относительно высокой устойчивостью. *M. osloensis*, например, хорошо переносят высушивание и действие ультрафиолета, даже в большей степени, чем *E. coli* и *S. aureus*, что обусловлено содержащимися в клеточной мембране липидами и жирными кислотами [24, 25]. Можно предположить, что симбиоз с такими бактериями весьма полезен для других ассоциантов, в частности энтерококков и гарднерелл, поскольку они способны нейтрализовать антагонистическое действие представителей нормальной микрофлоры и эффекторов иммунной системы. В настоящее время *M. osloensis* относят к оппортунистическим патогенам, при том что их патогенный потенциал увеличивается при «старении» штаммов. Например, 60-часовые культуры оказались в несколько раз более вирулентными, чем 24-часовые, которые практически не оказывали повреждающего действия на тест-объекты [26].

Остается нерешенным вопрос о продукции токсина(ов), хотя логично предположить, что описанные выше эффекты могут быть связаны с тем, что через 60 ч инкубации культуры *M. osloensis* или существенно увеличивают продукцию, или накапливают токсин(ы). В целом для представителей рода описаны такие факторы патогенности, как липополисахарид, фимбрии, выработка капсулоподобного вещества и гемагглютинина [26]. Наличие такого комплекса факторов патогенности в совокупности с медленным накоплением токсина(ов) позволяет предположить, что *M. osloensis* могут играть ключевую роль в поддержании патосимбиоза, особенно при хроническом воспалении.

Особый интерес в этой связи вызывает накопившаяся к настоящему времени информация о том, что долговременная колонизация органа определенными видами бактерий, вызывающими локальный генотоксический стресс, может стать причиной клеточной трансформации и в конечном счете привести к раку. Генотоксический стресс, в свою очередь, может быть следствием хронического воспаления, вызванного бактериями, накопления их метаболитов в тканях и органах. Установлено, что генотоксины приводят к увеличению повреждений ДНК и блокировке систем репарации [27]. Сведений о продукции подобных метаболитов *M. osloensis* в литературе мы не обнаружили, хотя считаем такую их способность вероятной.

Представляется, что *M. osloensis*, доминирующие в репродуктивном тракте субфертильных пациентов, способствуют развитию и поддерживают бессимптомный воспалительный процесс, а медленное накопление токсина может оказывать пролонгированное повреждающее действие на га-

меты. Более того, постоянное присутствие моракселл в микробиоте при ОГГИ может указывать и на их определенную патогенетическую активность, и на синергичный характер взаимоотношений между *M. osloensis* и *N. gonorrhoeae*.

В истории изучения вагинальной микробиоты есть примеры, когда трудно объяснимая встречаемость одного и того же микроорганизма в отсутствие симптоматики и при установленной патологии, в том числе при БВ, находила достаточно неожиданное объяснение. Так случилось, например, при детальном изучении представителей рода *Gardnerella*: факты позволяют предположить, что у здоровых женщин преобладают штаммы (или виды) гарднерелл с низкой вирулентностью, а за развитие заболевания, которое даже предлагается вновь называть гарднереллезом [28], отвечают высоковирулентные разновидности этих бактерий [29–32]. Авторы отмечают важную для развития полиэтиологического БВ особенность гарднерелл — их способность к симбиозу с другими условно-патогенными анаэробами, предоставляя последним комфортную среду обитания [33].

Аналогичные гипотезы возникают при анализе биологических особенностей и частоты встречаемости моракселл в микробиоте генитального тракта обследованных мужчин и женщин. Отсутствие информации о связи этих бактерий с БВ, как, впрочем, и о прямой причастности последнего к снижению фертильности, с одной стороны, и выявление типичных признаков этого дисбиотического состояния (существенное снижение доли лактобактерий, присутствие *G. vaginalis*) — с другой, представляется нам фактом интересным и требующим пристального дальнейшего изучения. Можно полагать, что именно *M. osloensis* в ассоциациях с другими оппортунистическими патогенами, в частности *G. vaginalis* и *E. faecalis*, формируют консорциумы, обуславливающие устойчивый патосимбиоз, встречающийся в репродуктивном тракте, в том числе при бесплодии. Поскольку с каждым годом увеличивается число случаев, когда детектируют хронические воспалительные процессы в репродуктивном тракте, отличающиеся отсутствием клинических симптомов, но в то же время существенным поражением и даже деструкцией клеток человека [34], снижение фертильности при устойчиво сложившемся симбиозе, включающем моракселлы, можно рассматривать как индикаторное состояние для этой патологии, а *M. osloensis* — как её маркер.

Заключение

При метагеномном исследовании отделяемого генитального тракта мужчин и женщин, состоящих в бесплодном браке, зарегистрирована высокая частота встречаемости и зачастую значительная доля генетического материала *Moraxella* spp., в первую очередь *M. osloensis*, детектируемых в ассоциации

с фрагментами генома *E. faecalis* и *G. vaginalis*. Наличие таких консорциумов в микробиоте репродуктивных органов указывает на возможную роль моракселл в поддержании патосимбиоза, обуславливающего бессимптомный хронический воспалительный процесс, приводящий, в частности, к снижению фертильности.

Данных об индуцируемых микробиотой генитального тракта генотоксических эффектах и мутагенезе, обусловленном и (или) модулируемом бактериями, в частности о способности моракселл к продукции генотоксинов, в доступной литературе мы не обнаружили. Однако исследования в этом направлении, в том числе при бесплодии, следует признать перспективными и целесообразными.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Kamińska D., Gajecka M. Is the role of human female reproductive tract microbiota underestimated? *Benef. Microbes*. 2017; 8(3): 327–43. <https://doi.org/10.3920/BM2015.0174>
2. Buchta V. Vaginal microbiome. *Ceska Gynekol. Winter*. 2018; 83(5): 371–9.
3. Gardner H.L., Dukes C.D. Haemophilus vaginalis vaginitis: a newly defined specific infection previously classified non-specific vaginitis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1955; 69(5): 962–76.
4. Piot P., Van Dyck E., Totten P.A., Holmes K.K. Identification of *Gardnerella (Haemophilus) vaginalis*. *J. Clin. Microbiol.* 1982; 15(1): 19–24. <https://doi.org/10.1128/jcm.15.1.19-24.1982>
5. Machado A., Cerca N. Influence of biofilm formation by *Gardnerella vaginalis* and other anaerobes on bacterial vaginosis. *J. Infect. Dis.* 2015; 212(12): 1856–61. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv338>
6. Damke E., Kurscheidt F.A., Irie M.M.T., Gimenes F., Consolaro M.E.L. Male partners of infertile couples with seminal positivity for markers of bacterial vaginosis have impaired fertility. *Am. J. Mens. Health.* 2018; 12(6): 2104–15. <https://doi.org/10.1177/1557988318794>
7. Ravel J., Gajer P., Abdo Z., Schneider G.M., Koenig S.S., McCulle S.L., et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011; 108(Suppl. 1): 4680–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002611107>
8. Martin D.H., Marrazzo J.M. The vaginal microbiome: current understanding and future directions. *J. Infect. Dis.* 2016; 214(Suppl. 1): S36–41. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw184>
9. Martin D.H., Zozaya M., Lillis R., Miller J., Ferris M.J. The microbiota of the human genitourinary tract: trying to see the forest through the trees. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 2012; 123: 242–56.
10. Hong X., Fang S., Huang K., Yin J., Chen J., Xuan Y., et al. Characteristics of the vaginal microbiome in cross-border female sex workers in China: a case-control study. *PeerJ*. 2019; 7: e8131. <https://doi.org/10.7717/peerj.8131>
11. Li F., Chen C., Wei W., Wang Z., Dai J., Hao L., et al. The metagenome of the female upper reproductive tract. *Giga-science*. 2018; 7(10): giy107. <http://doi.org/10.1093/gigascience/giy107>
12. Morax V. Note sur un diplobacille pathogène pour la conjunctivite humaine. *Ann. Inst. Pasteur*. 1896; 10: 337–45.
13. LaCroce S.J., Wilson M.N., Romanowski J.E., Newman J.D., Jhanji V., Shanks R.M.Q., et al. *Moraxella nonliquefaciens* and *M. osloensis* are important *Moraxella* species that cause ocular infections. *Microorganisms*. 2019; 7(6): 163. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7060163>
14. Henriksen S.D. *Moraxella*, *Acinetobacter*, and the *Mimeae*. *Bacteriol. Rev.* 1973; 37(4): 522–61.

15. Riley P.S., Hollis D.G., Weaver R.E. Characterization and differentiation of 59 strains of *Moraxella urethralis* from clinical specimens. *Appl. Microbiol.* 1974; 28(3): 355–8.
16. Abdolrasouli A., Amin A., Baharsefat M., Roushan A., Hemmati Y. *Moraxella catarrhalis* associated with acute urethritis imitating gonorrhoea acquired by oral-genital contact. *Int. J. STD AIDS.* 2007; 18(8): 579–80. <http://doi.org/10.1258/095646207781439775>
17. Gómez-Camarasa C., Fernández-Parra J., Navarro-Marí J.M., Gutiérrez-Fernández J. *Moraxella osloensis* emerging infection. Visiting to genital infection. *Rev. Esp. Quimioter.* 2018; 31(2): 178–81. (in Spanish)
18. Coker D.M., Griffiths L.R. *Moraxella urethritis* mimicking gonorrhoea. *Genitourin. Med.* 1991; 67(2): 173–4. <http://doi.org/10.1136/sti.67.2.173-a>
19. Богун А.Г., Кисличкина А.А., Галкина Е.В., Майская Н.В., Соломенцев В.И., Мухина Т.Н. и др. Использование современных методов идентификации бактерий в деятельности государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ГКПМ-Оболенск). *Инфекция и иммунитет.* 2016; 6(3): 8.
20. Shaffer M., Armstrong A.J.S., Phelan V.V., Reisdorph N., Lopez C.A. Microbiome and metabolome data integration provides insight into health and disease. *Transl. Res.* 2017; 189: 51–64. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2017.07.001>
21. Кубанов А.А., Барышков К.В., Честков А.В., Шаскольский Б.Л., Грудянов Д.А., Дерябин Д.Г. Генотипическое разнообразие популяции *Neisseria gonorrhoeae* в Архангельске (Россия): механизмы формирования и связь с устойчивостью к антимикробным препаратам. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2018; 36(3): 43–8. <http://doi.org/10.17116/molgen20183603143>
22. Di Capua C., Bortolotti A., Farias M.E., Cortez N. UV-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from Andean wetlands display high catalase activity. *FEMS Microbiol. Lett.* 2011; 317(2): 181–9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02231.x>
23. Kubota H., Mitani A., Niwano Y., Takeuchi K., Tanaka A., Yamaguchi N., et al. *Moraxella* species are primarily responsible for generating malodor in laundry. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012; 78(9): 3317–24. <https://doi.org/10.1128/aem.07816-11>
24. Beney L., Gervais P. Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001; 57(1-2): 34–42. <https://doi.org/10.1007/s002530100754>
25. Sugimoto C., Miyagawa E., Nakazawa M., Mitani K., Ishizawa Y. Cellular fatty acid composition comparisons of *Haemophilus equigenitalis* and *Moraxella* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1983; 33(2): 181–7. <https://doi.org/10.1099/00207713-33-2-181>
26. Tan L., Grewal P.S. Endotoxin activity of *Moraxella osloensis* against the grey garden slug, *Deroceras reticulatum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002; 68(8): 3943–7. <http://doi.org/10.1128/aem.68.8.3943-3947.2002>
27. Баранова Е.Д., Дружинин В.Г. Состав бактериальной микрофлоры человека: генотоксические и канцерогенные эффекты, ассоциированные с его изменениями в различных органах. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2019; 37(2): 58–63. <https://doi.org/10.17116/molgen20193702158>
28. Cerca N., Vanechoutte M., Guschin A., Swidsinski A. Polymicrobial infections and biofilms in women's health: Gahro Expert Group Meeting Report. *Res. Microbiol.* 2017; 168(9-10): 902–4. <http://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.07.002>
29. Khan S., Voordouw M.J., Hill J.E. Competition among *Gardnerella* subgroups from the human vaginal microbiome. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019; 9: 374. <http://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00374>
30. Hill J.E., Albert A.Y.K., VOGUE Research Group. Resolution and cooccurrence patterns of *Gardnerella leopoldii*, *G. swidsinskii*, *G. piotii*, and *G. vaginalis* within the vaginal microbiome. *Infect. Immun.* 2019; 87(12): e00532-19. <http://doi.org/10.1128/IAI.00532-19>
31. Castro J., Jefferson K.K., Cerca N. Genetic heterogeneity and taxonomic diversity among *Gardnerella* species. *Trends Microbiol.* 2020; 28(3): 202–11. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2019.10.002>
32. Nisha K., Antony B., Udayalaxmi J. Comparative analysis of virulence factors & biotypes of *Gardnerella vaginalis* isolated from the genital tract of women with & without bacterial vaginosis. *Indian. J. Med. Res.* 2019; 149(1): 57–61. http://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1674_16
33. Савичева А.М., Крысанова А.А., Лищук О.В. Единственная в своём роде? *StatusPraesens. Гинекология, акушерство, бесплодный брак.* 2019; (5): 32–40.
34. Belkaid Y., Hand T.W. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell.* 2014; 157(1): 121–41. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.011>

REFERENCES

1. Kamińska D., Gajecka M. Is the role of human female reproductive tract microbiota underestimated? *Benef. Microbes.* 2017; 8(3): 327–43. <https://doi.org/10.3920/BM2015.0174>
2. Buchta V. Vaginal microbiome. *Ceska Gynekol. Winter.* 2018; 83(5): 371–9.
3. Gardner H.L., Dukes C.D. *Haemophilus vaginalis* vaginitis: a newly defined specific infection previously classified non-specific vaginitis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1955; 69(5): 962–76.
4. Piot P., Van Dyck E., Totten P.A., Holmes K.K. Identification of *Gardnerella (Haemophilus) vaginalis*. *J. Clin. Microbiol.* 1982; 15(1): 19–24. <https://doi.org/10.1128/jcm.15.1.19-24.1982>
5. Machado A., Cerca N. Influence of biofilm formation by *Gardnerella vaginalis* and other anaerobes on bacterial vaginosis. *J. Infect. Dis.* 2015; 212(12): 1856–61. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv338>
6. Damke E., Kurscheidt F.A., Irie M.M.T., Gimenes F., Consolaro M.E.L. Male partners of infertile couples with seminal positivity for markers of bacterial vaginosis have impaired fertility. *Am. J. Mens. Health.* 2018; 12(6): 2104–15. <https://doi.org/10.1177/1557988318794>
7. Ravel J., Gajer P., Abdo Z., Schneider G.M., Koenig S.S., McCulle S.L., et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011; 108(Suppl. 1): 4680–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002611107>
8. Martin D.H., Marrazzo J.M. The vaginal microbiome: current understanding and future directions. *J. Infect. Dis.* 2016; 214(Suppl. 1): S36–41. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw184>
9. Martin D.H., Zozaya M., Lillis R., Miller J., Ferris M.J. The microbiota of the human genitourinary tract: trying to see the forest through the trees. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 2012; 123: 242–56.
10. Hong X., Fang S., Huang K., Yin J., Chen J., Xuan Y., et al. Characteristics of the vaginal microbiome in cross-border female sex workers in China: a case-control study. *PeerJ.* 2019; 7: e8131. <https://doi.org/10.7717/peerj.8131>
11. Li F., Chen C., Wei W., Wang Z., Dai J., Hao L., et al. The metagenome of the female upper reproductive tract. *Gigascience.* 2018; 7(10): giy107. <http://doi.org/10.1093/gigascience/giy107>
12. Morax V. Note sur un diplobacille pathogène pour la conjunctivite humaine. *Ann. Inst. Pasteur.* 1896; 10: 337–45.
13. LaCroce S.J., Wilson M.N., Romanowski J.E., Newman J.D., Jhanji V., Shanks R.M.Q., et al. *Moraxella nonliquefaciens* and *M. osloensis* are important *Moraxella* species that cause ocular infections. *Microorganisms.* 2019; 7(6): 163. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7060163>

14. Henriksen S.D. *Moraxella*, *Acinetobacter*, and the *Mimeae*. *Bacteriol. Rev.* 1973; 37(4): 522–61.
15. Riley P.S., Hollis D.G., Weaver R.E. Characterization and differentiation of 59 strains of *Moraxella urethralis* from clinical specimens. *Appl. Microbiol.* 1974; 28(3): 355–8.
16. Abdolrasouli A., Amin A., Baharsefat M., Roushan A., Hemmati Y. *Moraxella catarrhalis* associated with acute urethritis imitating gonorrhoea acquired by oral-genital contact. *Int. J. STD AIDS.* 2007; 18(8): 579–80.
<http://doi.org/10.1258/095646207781439775>
17. Gómez-Camarasa C., Fernández-Parra J., Navarro-Marí J.M., Gutiérrez-Fernández J. *Moraxella osloensis* emerging infection. Visiting to genital infection. *Rev. Esp. Quimioter.* 2018; 31(2): 178–81. (in Spanish)
18. Coker D.M., Griffiths L.R. *Moraxella urethritis* mimicking gonorrhoea. *Genitourin. Med.* 1991; 67(2): 173–4.
<http://doi.org/10.1136/sti.67.2.173-a>
19. Bogun A.G., Kislichkina A.A., Galkina E.V., Mayskaya N.V., Solomentsev V.I., Mukhina T.N., et al. Using modern methods for identifying bacteria in the activities of the state collection of pathogenic microorganisms and cell cultures (GKPM-Obolensk). *Infektsiya i immunitet.* 2016; 6(3): 8 (in Russ)
20. Shaffer M., Armstrong A.J.S., Phelan V.V., Reisdorph N., Lopez C.A. Microbiome and metabolome data integration provides insight into health and disease. *Transl. Res.* 2017; 189: 51–64. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2017.07.001>
21. Kubanov A.A., Baryshkov K.V., Chestkov A.V., Shaskol'skiy B.L., Grudyanov D.A., Deryabin D.G. Genotypic diversity of the *Neisseria gonorrhoeae* population in Arkhangelsk (Russia): mechanisms of formation and relationship with antimicrobial resistance. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya.* 2018; 33(3): 201–6. (in Russ)
<http://doi.org/10.17116/molgen20183603143>
22. Di Capua C., Bortolotti A., Fariás M.E., Cortez N. UV-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from Andean wetlands display high catalase activity. *FEMS Microbiol. Lett.* 2011; 317(2): 181–9.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02231.x>
23. Kubota H., Mitani A., Niwano Y., Takeuchi K., Tanaka A., Yamaguchi N., et al. *Moraxella* species are primarily responsible for generating malodor in laundry. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012; 78(9): 3317–24. <https://doi.org/10.1128/aem.07816-11>
24. Beney L., Gervais P. Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001; 57(1-2): 34–42.
<https://doi.org/10.1007/s002530100754>
25. Sugimoto C., Miyagawa E., Nakazawa M., Mitani K., Ishizawa Y. Cellular fatty acid composition comparisons of *Haemophilus equigenitalis* and *Moraxella* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1983; 33(2): 181–7.
<https://doi.org/10.1099/00207713-33-2-181>
26. Tan L., Grewal P.S. Endotoxin activity of *Moraxella osloensis* against the grey garden slug, *Deroceras reticulatum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002; 68(8): 3943–7.
<http://doi.org/10.1128/aem.68.8.3943-3947.2002>
27. Baranova E.D., Druzhinin V.G. Human bacterial microflora composition: genotoxic and carcinogenic effects associated with its changes in various organs. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya.* 2019; 34(2): 75–80. (in Russ.)
<https://doi.org/10.17116/molgen20193702158>
28. Cerca N., Vanechoutte M., Guschin A., Swidsinski A. Polymicrobial infections and biofilms in women's health: Gahro Expert Group Meeting Report. *Res. Microbiol.* 2017; 168(9-10): 902–4.
<http://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.07.002>
29. Khan S., Voordouw M.J., Hill J.E. Competition among *Gardnerella* subgroups from the human vaginal microbiome. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019; 9: 374.
<http://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00374>
30. Hill J.E., Albert A.Y.K., VOGUE Research Group. Resolution and cooccurrence patterns of *Gardnerella leopoldii*, *G. swidsinskii*, *G. piovii*, and *G. vaginalis* within the vaginal microbiome. *Infect. Immun.* 2019; 87(12): e00532-19.
<http://doi.org/10.1128/IAI.00532-19>
31. Castro J., Jefferson K.K., Cerca N. Genetic heterogeneity and taxonomic diversity among *Gardnerella* species. *Trends Microbiol.* 2020; 28(3): 202–11.
<http://doi.org/10.1016/j.tim.2019.10.002>
32. Nisha K., Antony B., Udayalaxmi J. Comparative analysis of virulence factors & biotypes of *Gardnerella vaginalis* isolated from the genital tract of women with & without bacterial vaginosis. *Indian. J. Med. Res.* 2019; 149(1): 57–61.
http://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1674_16
33. Savicheva A.M., Krysanova A.A., Lishchuk O.V. One of a kind? *StatusPraesens*. *Ginekologiya, akusherstvo, besplodnyy brak.* 2019; (5): 32–40. (in Russ.)
34. Belkaid Y., Hand T.W. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell.* 2014; 157(1): 121–41.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.011>

Информация об авторах

Годовалов Анатолий Петрович[✉] — к.м.н., в.н.с. ЦНИЛ, доц. каф. микробиологии и вирусологии ПГМУ им. акад. Е.А. Вагнера, Пермь, Россия, agodovalov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5112-2003>

Карпунина Наталья Сергеевна — д.м.н., проф. каф. госпитальной терапии и кардиологии ПГМУ им. акад. Е.А. Вагнера, Пермь, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3127-1797>

Карпунина Тамара Исаковна — д.б.н., проф. каф. микробиологии и вирусологии ПГМУ им. акад. Е.А. Вагнера, Пермь, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2511-4656>

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

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

Статья поступила в редакцию 08.06.2020;
принята к публикации 15.11.2020; опубликована 25.02.2021.

Information about the authors

Anatoliy P. Godovalov[✉] — PhD (Med.), leading researcher, Central scientific research laboratory, Assoc. Prof., Microbiology and virology department, E.A. Vagner Perm State Medical University, Perm, Russia, agodovalov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5112-2003>

Natalia S. Karpunina — D. Sci. (Med.), Prof., Hospital therapy and cardiology department, E.A. Vagner Perm State Medical University, Perm, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3127-1797>

Tamara I. Karpunina — D. Sci. (Biol.), Prof., Microbiology and virology department, E.A. Vagner Perm State Medical University, Perm, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2511-4656>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

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

The article was submitted 08.06.2020;
accepted for publication 15.11.2020; published 25.02.2021.

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-95>

Состав микрофлоры и состояние системы сигнальных образ-распознающих рецепторов семейства Toll-подобных клеточных факторов врожденного иммунитета во время 120-суточной изоляции в гермообъекте с искусственной средой обитания

Ильин В.К.[✉], Орлов О.И., Рыкова М.П., Комиссарова Д.В., Усанова Н.А., Антропова Е.Н., Кутько О.В., Калинин С.А., Пономарев С.А., Шеф К.А., Сахарова А.В.

Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

Аннотация

Цель работы — оценка влияния условий 120-суточной изоляции в гермообъекте с искусственной средой обитания на формирование микробиоценоза и систему сигнальных образ-распознающих рецепторов семейства Toll-like (TLRs) врожденного иммунитета.

Материалы и методы. Изучали микрофлору кишечника и верхних дыхательных путей, содержание в периферической крови моноцитов и гранулоцитов, экспрессирующих TLRs (TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, TLR9), и базальную продукцию цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ФНО- α) иммунокомпетентными клетками у 6 испытуемых-добровольцев. Для предотвращения дисбактериоза кишечника и верхних дыхательных путей были использованы две группы препаратов: коммерческие штаммы пробиотиков и аутопробиотики, изготовленные на основе представителей протективной микрофлоры, изолированных индивидуально от каждого испытуемого.

Результаты. Пребывание здорового человека в искусственной среде обитания оказало существенное влияние на состояние микрофлоры и систему TLRs клеток врожденного иммунитета. В работе впервые продемонстрированы однонаправленные изменения абсолютного содержания в периферической крови моноцитов, экспрессирующих TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, TLR9, и общего микробного числа в желудочно-кишечном тракте и верхних дыхательных путях с 30-х по 120-е сутки экспериментального воздействия. Пероральный прием аутопробиотических препаратов способствовал снижению содержания условно-патогенной микрофлоры, одновременно поддерживая высокий уровень защитной микрофлоры кишечника, а также повышению продукции ФНО- α и ИЛ-10 иммунокомпетентными клетками периферической крови *in vitro*.

Ключевые слова: микрофлора, пробиотики, врожденный иммунитет, Toll-подобные рецепторы, цитокины, обитаемые гермопомещения

Финансирование. Работа выполнена при частичной поддержке базового финансирования РАН по темам 64.2 и 65.1.

Для цитирования: Ильин В.К., Орлов О.И., Рыкова М.П., Комиссарова Д.В., Усанова Н.А., Антропова Е.Н., Кутько О.В., Калинин С.А., Пономарев С.А., Шеф К.А., Сахарова А.В. Состав микрофлоры и состояние системы сигнальных образ-распознающих рецепторов семейства Toll-подобных клеточных факторов врожденного иммунитета во время 120-суточной изоляции в гермообъекте с искусственной средой обитания. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2021; 98(1): 36–45.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-95>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-95>

Composition of microflora and state of the system of signal image-recognizing receptors of the family of Toll-like cell factors of innate immunity during 120-day isolation in sealed compartment

Vyacheslav K. Ilyin[✉], Oleg I. Orlov, Marina P. Rykova, Daria V. Komissarova, Nonna A. Usanova, Eugenia N. Antropova, Olga V. Kutko, Sergey A. Kalinin, Sergey A. Ponomarev, Kirill A. Shef, Yulia A. Morozova, Alexandra V. Sakharova

Institute of Biomedical Problems, Moscow, Russia

Abstract

Aim. This work was undertaken to assess the effect of 120-day isolation conditions in a sealed compartment with an artificial habitat on the formation of microbiocenosis and the system of signaling image-recognizing receptors of the Toll-like (TLR) family of innate immunity.

Materials and methods. The microflora of the intestine and upper respiratory tract, as well as the content of monocytes and granulocytes expressing TLRs (TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, TLR9) in the peripheral blood, and the basal production of cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α) by immunocompetent cells of six volunteers was studied. To prevent intestinal and upper respiratory tract dysbiosis, two groups of medication were used: commercial strains (Linex and Bifidumbacterin Forte) and autoprobiotics made on the basis of protective microflora representatives isolated from each individual before the experiment.

Results. The studies showed that the stay of a healthy person in an artificial environment had a significant impact on the state of microflora and the system of TLRs of innate immunity cells. This work demonstrates for the first time unidirectional changes in the absolute content of monocytes in the peripheral blood expressing TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, TLR9, and the total microbial count in the gastrointestinal tract and in the upper respiratory tract from the 30th to the 120th day of the experimental exposure. Oral administration of autoprobiotic medication contributed to a decrease in the content of opportunistic microflora, while maintaining a high level of protective intestinal microflora, as well as an increase in the production of TNF- α and IL-10 by immunocompetent peripheral blood cells *in vitro*.

Keywords: *microflora, probiotics, innate immunity, Toll-like receptors, cytokines, sealed habitats*

Funding. This work was carried out with partial support from the base funding of the Russian Academy of Sciences on themes 64.2 and 65.1.

For citation: Ilyin V.K., Orlov O.I., Rykova M.P., Komissarova D.V., Usanova N.A., Antropova E.N., Kut'ko O.V., Kalinin S.A., Ponomarev S.A., Shef K.A., Sakharova A.V. Composition of microflora and state of the system of signal image-recognizing receptors of the cell factors Toll-like family of innate immunity during 120-day isolation in sealed compartment. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(1):36–45. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-95>

В настоящее время более чем очевидно, что организм человека существует в биоценозе с его постоянной микрофлорой. Сложные сообщества микробов, которые включают бактерии, грибы и другие виды микроорганизмов, играют фундаментальную роль в физиологических и патологических процессах организма хозяина. За последние два десятилетия появилось большое число публикаций, посвященных рассмотрению механизмов взаимодействия иммунной системы с симбиотическими микроорганизмами. Как показали клинические и экспериментальные исследования, микробиом человека, центральным органом которого являются пристеночные эпителиальные биопленки, оказывает существенное влияние на функционирование иммунной системы. В свою очередь, иммунная система в значительной степени развивалась как средство для поддержания симбиотических отношений хозяина с разнообразными микробами [1].

Особый вклад в формирование новых представлений о механизмах взаимодействия микрофлоры с иммунокомпетентными клетками внесли результаты изучения Toll-подобных рецепторов (TLRs), являющихся главными компонентами системы врожденного иммунитета [2]. Совокупность различных TLRs в комплексе с другими рецепторами и структурами обеспечивает распознавание целого ряда консервативных структур микроорганизмов и вирусов, таких как липополисахарид, пептидогликан, липопептиды и липотейхоевые кислоты, флагеллин, бактериальная и вирусная ДНК, вирусная двухцепочечная РНК. Распознавание этих

лигандов ведет к запуску каскада реакций, которые через адаптор MyD88 активируют транскрипционный ядерный фактор NF- κ B. Этот фактор связывается с промоторными участками ряда генов, обеспечивает их экспрессию и синтез про- и противовоспалительных цитокинов, фактора некроза опухоли- α (ФНО- α) и ряда других биоактивных соединений [3]. В последние годы появляется все больше исследований, свидетельствующих о том, что многие лиганды, взаимодействующие с TLRs, характерны не только для патогенных микроорганизмов, но и для условно-патогенных бактерий и представителей нормальной микрофлоры [4].

В современных условиях резко возросло число стрессовых воздействий и неблагоприятных экологических факторов, сопровождающихся глубокими нарушениями микробной экологии организма хозяина [5]. Следствие этих влияний — формирование различного вида дисбиозов и вторичных иммунодефицитных состояний, при которых резко снижается резистентность организма и к экзогенной инфекции, и к эндогенным ее очагам, формирующимся на поверхности слизистых оболочек открытых полостей.

Особенно ярко действие экстремальных факторов внешней среды на организм человека проявляется при космических миссиях. Во время длительного пребывания в условиях космического полета космонавт подвергается комплексу разнообразных необычных воздействий, среди которых наиболее значимыми являются невесомость, нервно-эмоциональное напряжение, искусственная среда обита-

ния в герметически замкнутом помещении с искусственно создаваемым микроклиматом, гипергравитация при старте, маневрировании и приземлении, галактическое космическое излучение.

Многолетний опыт исследований микробного статуса человека в космических полетах на орбитальных станциях «Салют-6», «Салют-7», «Мир» и МКС позволили сформулировать концепцию периодического накопления потенциала патогенности в системе человек–микроб в длительном космическом полёте. Одной из составляющих этой концепции было формирование массовых очагов контаминации условно-патогенными микроорганизмами различных биотопов человеческого организма. В этом процессе преобладали грамположительные кокки, происходило угнетение анаэробных представителей микрофлоры, наблюдалась временная колонизация верхних дыхательных путей (ВДП) чужеродными микроорганизмами, главным образом стафилококками. При этом отмечалось снижение колонизационной резистентности космонавтов, проявляющееся в ослаблении барьера колонизации, сформированного непатогенной комменсальной микрофлорой практически во всех биотопах. Опасность данного процесса велика с точки зрения возможности развития оппортунистических инфекций у членов экипажей космических миссий [5, 6].

С другой стороны, результаты исследования системы TLRs у российских членов экипажей экспедиций на МКС выявили высокую вариабельность содержания в периферической крови моноцитов и гранулоцитов, несущих на своей поверхности TLR2, TLR4 и TLR6, экспрессии генов *TLR2* и *TLR6*, а также экспрессии генов молекул, участвующих в проведении сигнала через TLR-сигнальный путь и связанные с ним NF-κB-, JNK/p38-, IRF-сигнальные пути [7, 8]. Несмотря на достаточно большое количество работ, посвящённых изучению влияния факторов космического полёта на организм человека, подавляющее большинство исследований выполнено до и после космических экспедиций. В этой связи ключевую роль в изучении влияния факторов космического полёта на микробный статус и систему иммунитета играют наземные модели, позволяющие имитировать отдельные факторы космического полёта.

Целью настоящего исследования являлась оценка влияния условий 120-суточной изоляции в гермообъекте с искусственной средой обитания на формирование микробиоценоза и систему TLRs клеток врождённого иммунитета человека.

Материалы и методы

Исследование было включено в научную программу 120-суточного изоляционного эксперимента, проведённого на базе ИМБП РАН, рассмотрено

и одобрено Комиссией по биомедицинской этике ИМБП РАН. Все участники эксперимента дали информированное согласие на участие в нём.

В эксперименте воспроизводились условия реального космического полёта на Луну, включающие этапы:

- перелёт до спутника с последующим облётком для поиска места посадки;
- приземление 4 членов экипажа для проведения операций на поверхности Луны;
- пребывание на орбите Луны и дистанционное управление лунным ровером для подготовки базы;
- возвращение на Землю.

Микробиологическое исследование было разделено на две части. В 1-й части для обогащения напитка брожения (НБ) были использованы препараты-пробиотики: живые лиофилизированные молочнокислые бактерии *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium infantis*, *Enterococcus faecium* (линекс, «Sandoz») и бифидобактерии, сорбированные на активированном угле (бифидумбактерин форте, «ПроБиоФарм»). В предварительно восстановленный из порошка НБ (100 мл) на основе сахаромецета (10^7 КОЕ/мл) добавляли содержимое капсул линекс до конечной концентрации 10^7 КОЕ/мл и бифидумбактерин форте до конечной концентрации 10^8 КОЕ/мл. Полученный НБ использовался в качестве лечебно-профилактического питания исследователями экспериментальной группы (3 человека). Остальные исследователи (3 человека) принимали только НБ без добавления пробиотиков и составили контрольную группу. Курс приема НБ с добавлением пробиотиков составлял первые 15 сут изоляционного эксперимента.

Во 2-й части исследования участники экспериментальной группы получали НБ, обогащенный культурой бактерий *Lactobacillus*, выделенных от операторов (аутопробиотик), а обследуемые контрольной группы принимали только НБ, без добавления пробиотических препаратов. НБ с аутопробиотиками обследуемые принимали в течение 15 сут (с 60-х по 75-е сутки изоляционного эксперимента) по 250 мл 1 раз в день.

Методика изготовления аутопробиотического препарата включала в себя отбор проб фекалий у практически здоровых лиц в период их клинически здорового состояния за 30 дней до предполагаемого применения. Из проб выделяли ауштаммы лактобактерий и идентифицировали их. Биомассу выделенных микроорганизмов очищали и нарабатывали на селективной питательной среде MRS для культивирования лактобактерий в анаэробных условиях до титра не менее 10^7 – 10^8 КОЕ/мл. Нарботанную биомассу подвергали лиофилизации — высушиванию в замороженном состоянии под вакуумом в пенициллиновых флаконах. Содержание клеток

аутологичных лактобацилл и энтерококков в одном флаконе было не менее 10^7 КОЕ/мл.

Отбор проб фекалий у обследуемых проводили на 15, 30, 60, 90 и 120-е сутки пребывания в гермообъекте (окончание изоляционного эксперимента) и 7-е сутки после окончания изоляционного эксперимента.

Пробы со слизистых ВДП и кожных покровов отбирали на 15, 30, 45, 60, 75, 90 и 105-е сутки пребывания в гермообъекте и на 7-е сутки после окончания изоляционного эксперимента.

У участников эксперимента были проведены исследования количественного, родового и видового состава микробиоценоза кишечника, ВДП и кожи (нос, рот, миндалины, подмышечная впадина, пах). Для определения родового состава микрофлоры были выполнены классические бактериальные посе́вы на селективных средах (Эндо, Сабуро, MSA, энтерококкагар, цитрат Симменса, MRS, Протеус ППМ, среда Вильсон–Блер, Кандида-агар и бифидо-среда) с последующим подсчётом колоний для получения результатов по количественному составу микрофлоры и вычисления микробного числа (МЧ) по стандартной методике [9]. МЧ выражали в виде lg(КОЕ/мл).

Пробы венозной крови для иммунологических исследований забирали у всех испытуемых добровольцев натощак в утренние часы на 15, 29, 57, 87 и 120-е сутки пребывания в гермообъекте в вакуумные пробирки («Greiner Bio-One») со стандартным содержанием антикоагулянтов (K_3 -ЭДТА и гепарин).

Содержание лейкоцитов, абсолютное и относительное количество моноцитов и гранулоцитов в периферической крови определяли на автоматическом гематологическом анализаторе «Celltac-aaaaa-ааа МЕК 6318К» («Nihon Kohden»).

Уровень в периферической крови моноцитов и гранулоцитов, экспрессирующих TLRs, оценивали с помощью мультипараметрического метода иммунофлюоресцентного анализа лейкоцитов, окрашенных флюоресцентно мечеными антителами («eBioscience») к CD14, TLR1, TLR2, TLR4, TIR6, TLR9. Для определения внутриклеточной локализации TLR9 использовали пермебилизированные с применением коммерческого пермеабилизирующего раствора IntraPrep («Beckman Coulter») клетки. Анализ образцов клеточных суспензий проводили на проточном цитофлуориметре «FACSCalibur» («Becton Dickinson») в программе «CellQuest Pro». В каждом образце было проанализировано не менее 100 тыс. событий.

Базальную продукцию цитокинов определяли в культурах клеток цельной крови. Для этого гепаринизированную (20 ЕД/мл) венозную кровь разводили в 5 раз средой RPMI-1640 («Sigma-Aldrich»), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина,

5 mM HEPES-буфера и 100 мкг/мл гентамицина, и культивировали в течение 24 ч в круглодонных стерильных пробирках. Культивирование проводили при 37°C в CO₂-инкубаторе, после чего собирали супернатанты и хранили полученные образцы при –80°C до тестирования. В супернатантах культур определяли содержание цитокинов: интерлейкина (ИЛ) -1β, -6, -8, -10, ФНО-α с использованием коммерческого набора «Human Cytokine/Chemokine Panel I» («Millipore») для определения цитокинов методом мультиплексного анализа.

Результаты эксперимента были обработаны с использованием пакета прикладных программ «Statistica v.10.0 for Microsoft Windows». Данные исследования представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q25–Q75). Достоверность полученных результатов оценивали при помощи непараметрического критерия Вилкоксона.

Результаты и обсуждение

Исследования количественного и видового состава микробиоценоза кишечника и ВДП показали, что видовое разнообразие условно-патогенной микрофлоры во всех биотопах как в контрольной, так и в опытной группах на начало исследования было значительным.

После приёма НБ с коммерческими штаммами экспериментальной группой существенных изменений в микрофлоре не произошло. Общее МЧ как протективной, так и условно-патогенной микрофлоры не изменилось. При этом после приёма НБ с аутопробиотиками общее МЧ протективной микрофлоры ВДП постепенно стабилизировалось, а также значительно снизилось (вплоть до исчезновения) содержание некоторых групп условно-патогенных микроорганизмов, что подтверждает пролонгированное протективное действие аутопробиотического препарата (рис. 1, а).

В контрольной группе произошло снижение общего МЧ протективной микрофлоры ВДП в первой половине эксперимента, что, по-видимому, соответствует острому периоду адаптации и его последствиям. При этом в середине эксперимента наблюдалось усиление роста условно-патогенной микрофлоры, а в конце изоляционного периода к уже имеющейся группе условно-патогенных микроорганизмов *S. aureus* добавился ещё один условно-патогенный вид — *Candida*, что на фоне уменьшения общего МЧ протективной микрофлоры свидетельствует о снижении колонизационного барьера ВДП и дестабилизации микробиоты (рис. 1, б).

При изучении микрофлоры кишечника в опытной группе после приёма коммерческих штаммов в составе НБ не было отмечено изменений в общем МЧ протективной микрофлоры, при этом к концу периода приёма препарата обнаруживались *S. aureus* и *Candida* spp. в достаточно высоком ти-

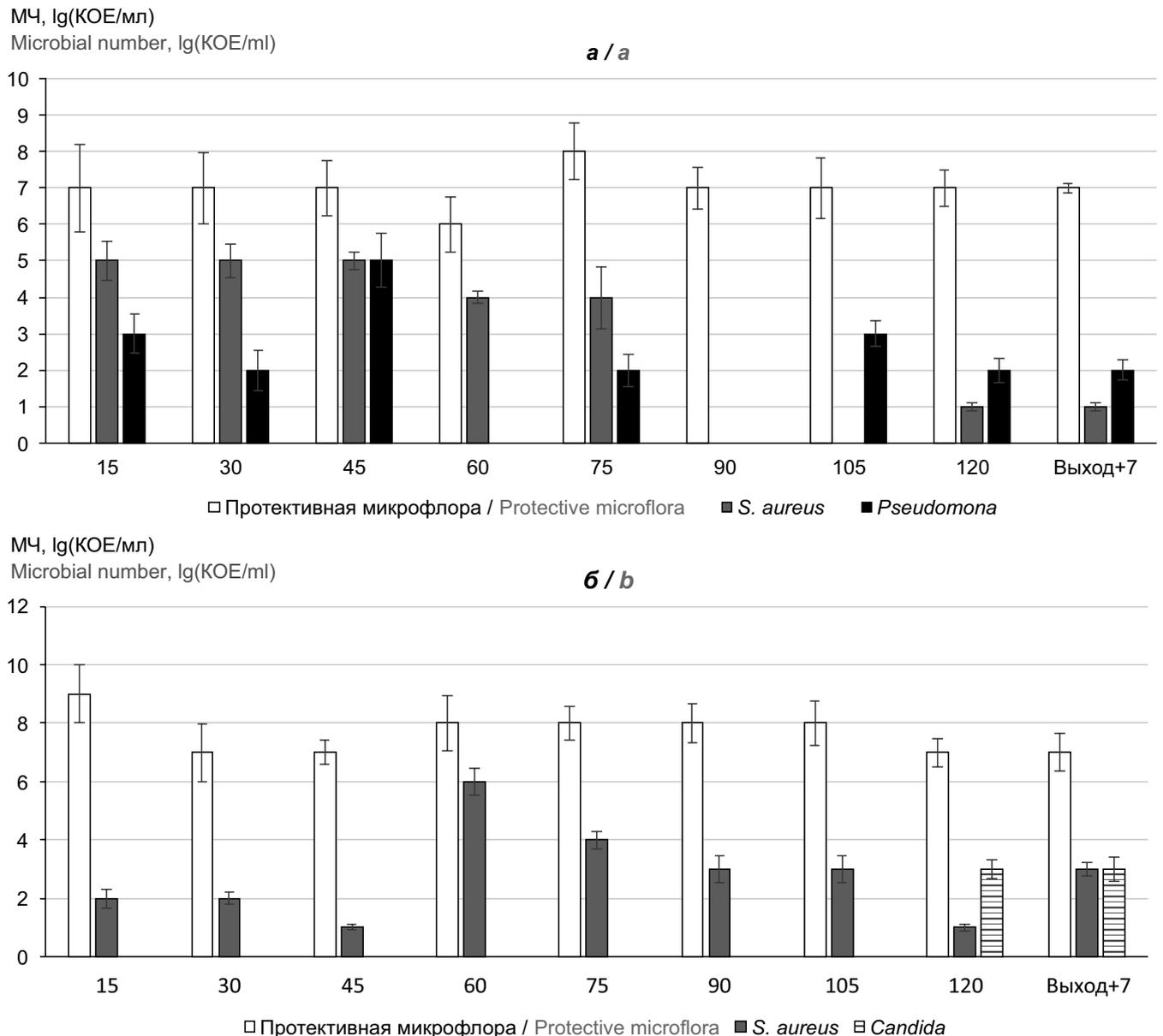


Рис. 1. Сравнение МЧ протективной и условно-патогенной микрофлоры ВДП у испыателей-добровольцев опытной (а) и контрольной (б) групп.

Fig. 1. Comparison of microbial quantity of protective and opportunistic microflora of upper respiratory tract of volunteers in experimental (a) and control (b) groups.

тре. После приёма НБ с добавлением аутопробиотиков условно-патогенная компонента микробиоты не была обнаружена, что говорит о большей эффективности аутопробиотических препаратов и усилении протективных способностей. Кроме того, только один из условно-патогенных видов микроорганизмов обнаружился в конце эксперимента (120-е сутки), причём в меньшем количестве, чем в начале эксперимента (рис. 2, а).

В контрольной группе не происходило существенного изменения МЧ протективной микрофлоры, однако МЧ условно-патогенной микрофлоры при этом возросло. Кроме того, в конце эксперимен-

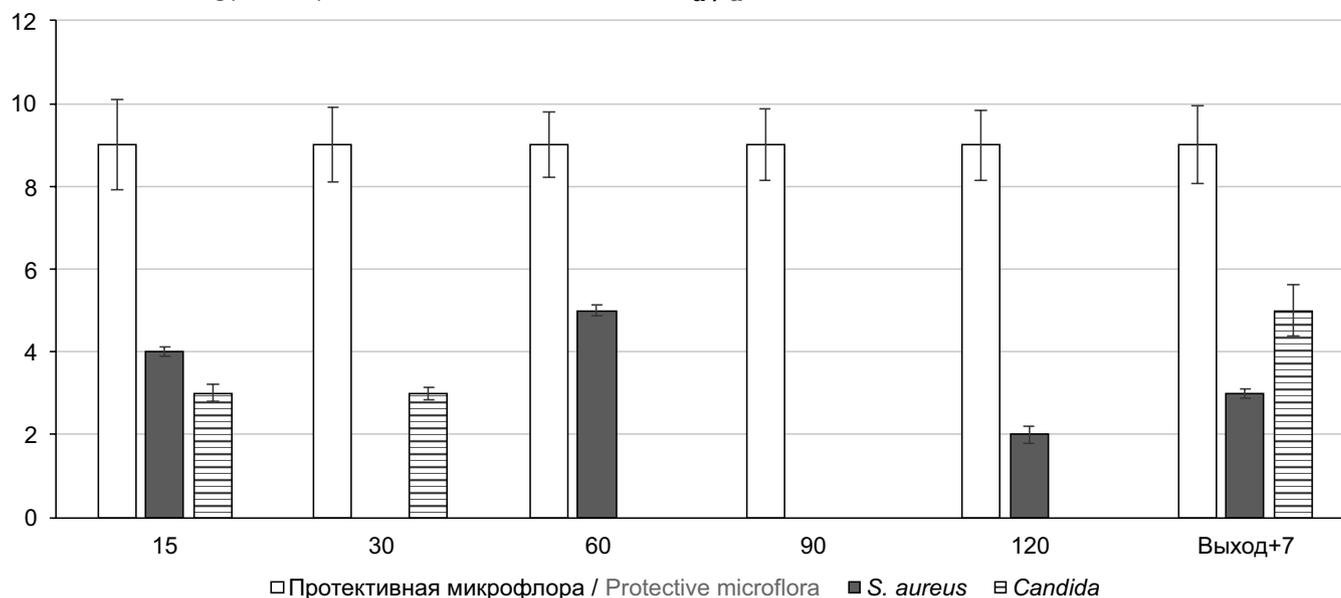
та, вероятно из-за микробного обмена между испыателями в замкнутом пространстве, появились виды, на первых этапах эксперимента не обнаруженные в микробиологических пробах (например, *Pseudomonas aeruginosa*), что говорит о дестабилизации, снижении протективности и ослаблении колонизационного барьера микрофлоры желудочно-кишечного тракта (рис. 2, б).

Следующий этап исследований включал оценку характера и степени выраженности изменений в системе сигнальных образ-распознающих рецепторов семейства TLRs клеток врожденного иммунитета у участников эксперимента во вре-

МЧ, lg(КОЕ/мл)

Microbial number, lg(CFU/ml)

a / a



МЧ, lg(КОЕ/мл)

Microbial number, lg(CFU/ml)

б / b

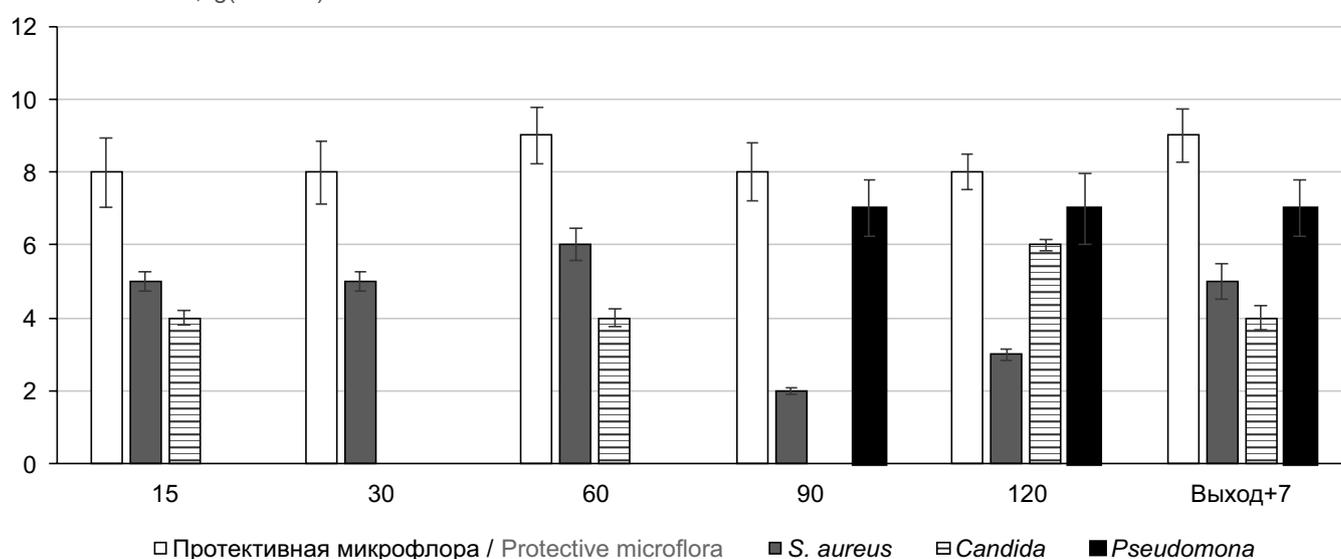


Рис. 2. Сравнение МЧ протективной и условно-патогенной микрофлоры желудочно-кишечного тракта у испыателей-добровольцев опытной (а) и контрольной (б) групп.

Fig. 2. Comparison of the microbial number of protective and opportunistic microflora of gastrointestinal tract of volunteers in experimental (a) and control (b) groups.

мя 120-суточной изоляции. Именно через активацию TLRs с поверхностной локализацией (TLR1, TLR2, TLR4, TLR6) происходит распознавание бактериальных структур (липополисахаридов, липопротеина, флагеллина и т.д.), а через активацию представителя семейства эндосомальных TLRs — TLR9 — связывание участков ДНК, обогащенных неметилированными последовательностями CpG (цитидин-фосфат гуанозин), характерных для ДНК бактерий [10–12].

Анализ абсолютного содержания в периферической крови моноцитов и гранулоцитов, экспрессирующих TLR1, TLR2, TLR4, TLR6 и TLR9, показал, что пребывание в гермообъекте в обеих группах сопровождалось изменениями, которые имели волнообразный характер (рис. 3). Представляет интерес тот факт, что по усредненным данным на протяжении всего исследования не выявлено существенных различий показателей, характеризующих рецепторный аппарат клеточных факторов врожденного

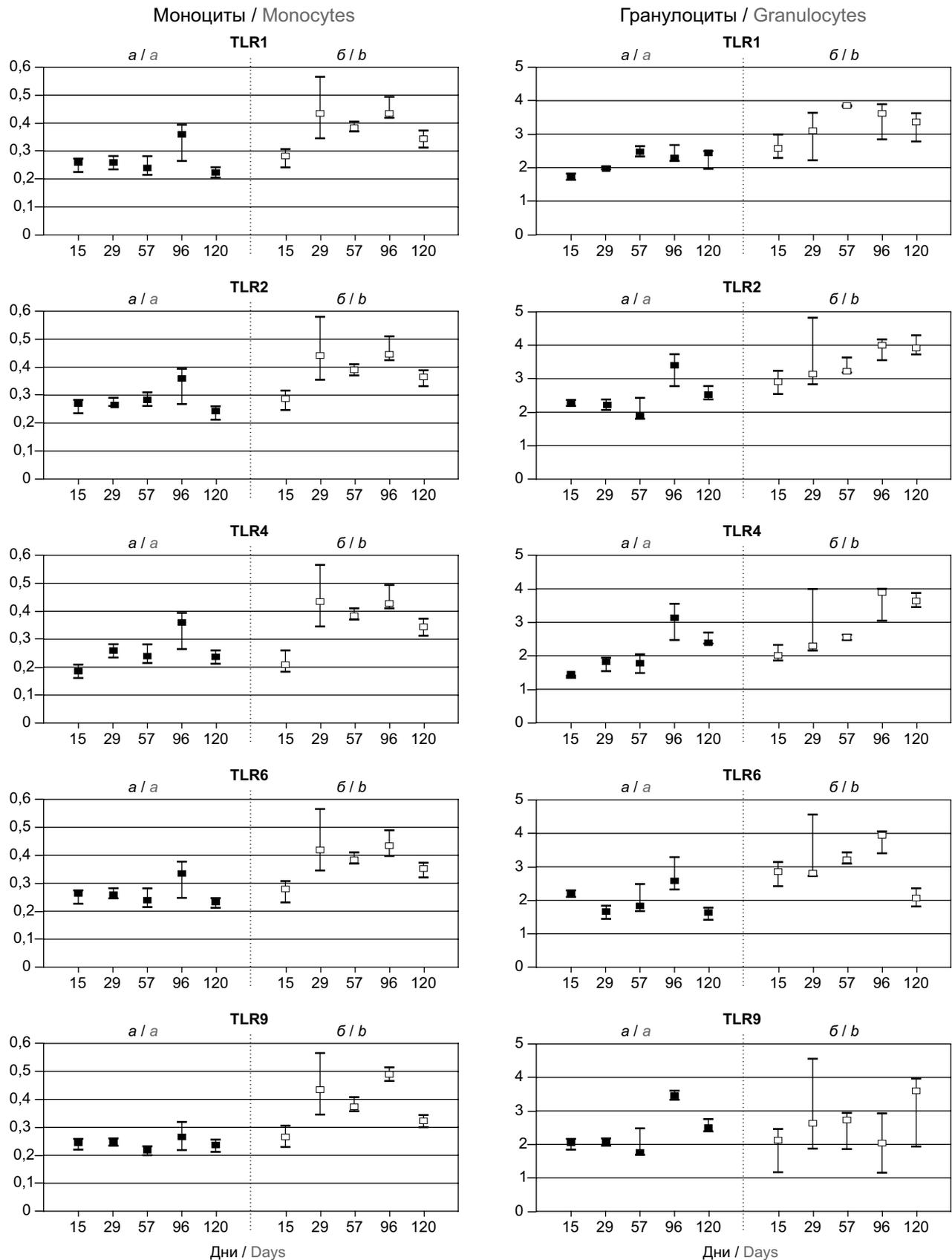


Рис. 3. Показатели субпопуляционного состава моноцитов ($\times 10^9/\text{л}$) и гранулоцитов ($\times 10^9/\text{л}$) в периферической крови испытуемых-добровольцев опытной (а) и контрольной (б) групп.

Fig. 3. Indicators of the subpopulation composition of monocytes ($\times 10^9/\text{liter}$) and granulocytes ($\times 10^9/\text{liter}$) in peripheral blood of volunteers in the experimental (a) and control (b) groups.

иммунитета. Однако при рассмотрении индивидуальных данных отмечено, что основной чертой реакции системы TLRs являлось повышение уровня TLR1⁺, TLR2⁺, TLR4⁺, TLR6⁺ и TLR9⁺-моноцитов и гранулоцитов. Так, наиболее выраженное повышение количества моноцитов, экспрессирующих эти рецепторы, наблюдалось на 29-е и 96-е сутки пребывания в гермообъекте, и гранулоцитов — на 57-е и 96-е сутки. В то же время у одного из обследованных на 29, 57, 96 и 120-е сутки периода изоляции, напротив, обнаружено существенное снижение абсолютного содержания в периферической крови моноцитов, экспрессирующих TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, TLR9. В эти сроки обследования у данного испытуемого также отмечалось снижение общего МЧ как в желудочно-кишечном тракте, так и на ВДП. В настоящее время трудно однозначно ответить на вопрос, с чем может быть связано изменение уровня TLRs у испытуемых-добровольцев во время пребывания в условиях длительной изоляции в гермообъекте. Можно предположить, что отмеченные особенности изменений в системе TLRs обусловлены характером изменений количественного и видового микробиоценоза.

Взаимодействуя с микробиотой, TLRs запускают ряд сигналов, которые влияют на синтез иммуномодулирующих цитокинов [13]. Определение продукции цитокинов клетками цельной крови позволяет охарактеризовать секреторную активность иммуноцитов и выявить дефекты биосинтеза ряда основных медиаторов межклеточного взаимодействия. При этом базальная продукция цитокинов иммунокомпетентными клетками свидетельствует о том, насколько эти клетки активированы *in vivo*. С нашей точки зрения, использование цельной крови устраняет вероятность нежелательной активации или гибели моноцитов и гранулоцитов. К тому же культивирование происходит в условиях естественного микроокружения, при сохранении баланса всех гуморальных факторов, действующих *in vivo*.

Изучение базальной способности иммунокомпетентных клеток секретировать в системе *in vitro* ряд цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α и ИЛ-10) позволило отметить следующие особенности (рис. 4). Во-первых, в периоде герметизации базальная продукция ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α и ИЛ-10 в опытной и контрольной группах существенно не различалась. Во-вторых, рассмотрение динамики индивидуальных данных показало, что у 2 обследуемых в опытной группе и 2 обследуемых в контрольной группе начиная с 60-х суток экспериментального воздействия увеличивалась базальная продукция всех цитокинов по сравнению с индивидуальным исходным уровнем, причём в обеих группах это повышение было более выражено на 96-е сутки. Однако такое повышение не было статистически достоверным. В то же время при анализе

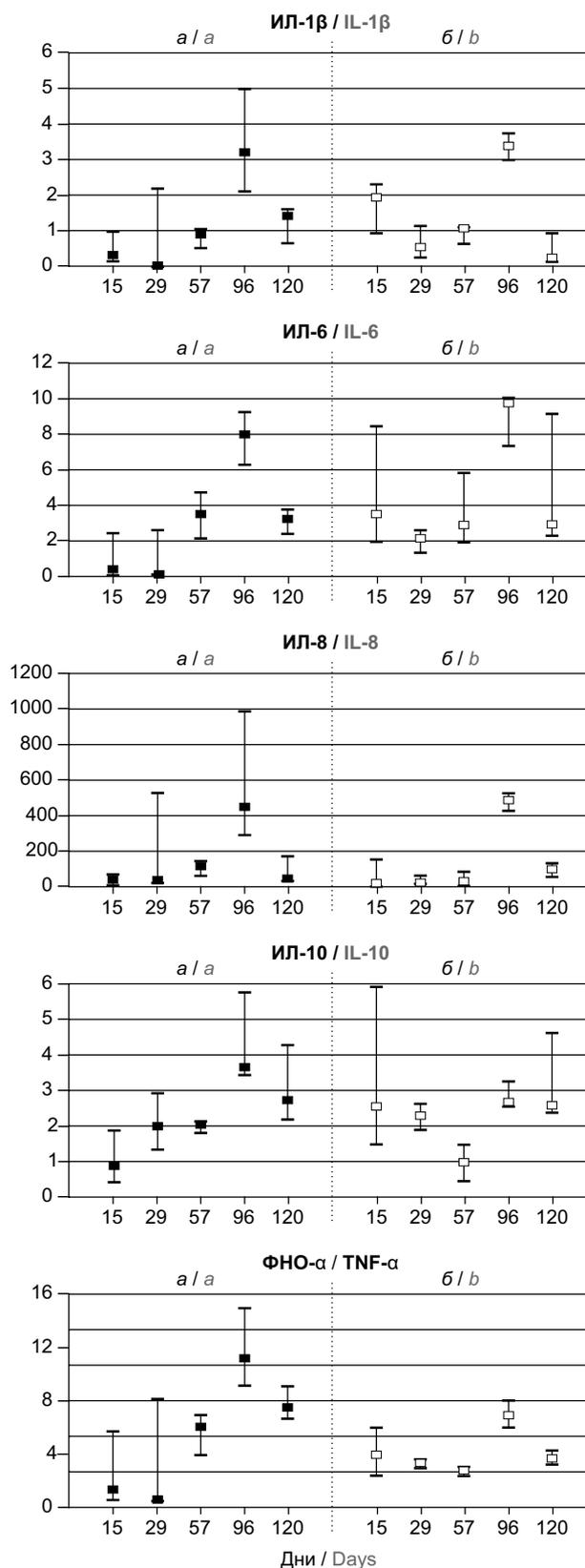


Рис. 4. Синтез цитокинов (пг/мл) в 24-часовых нестимулированных культурах клеток цельной крови испытуемых-добровольцев опытной (а) и контрольной (б) групп.

Fig. 4. Synthesis of cytokines (pg/ml) in 24-hour unstimulated whole blood cell cultures of volunteers of the experimental (a) and control (b) groups.

корреляционной взаимосвязи базального синтеза цитокинов и общего МЧ микрофлоры кишечника выявлено, что в конце экспериментального воздействия наблюдались средняя и высокая степени корреляции между общим МЧ и уровнем секреции некоторых цитокинов: в опытной группе — для ИЛ-1 β ($r = 0,982$), ИЛ-6 ($r = 0,925$) и ИЛ-10 ($r = 0,685$), а в контрольной группе — для ИЛ-1 β ($r = -0,559$), ИЛ-6 ($r = 0,999$), ИЛ-8 ($r = 0,797$) и ФНО- α ($r = 0,963$). Несмотря на незначительное число наблюдений, нельзя исключить значимость аутологичных лактобацилл и энтерококков в поддержании баланса провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α) и противовоспалительного цитокина ИЛ-10.

По-видимому, симбиотические бактерии, входящие в состав пробиотиков, могут оказывать иммуномодулирующее действие путем регуляции секреции цитокинов Th1- и Th2-типов [14]. Это действие пробиотических препаратов может быть обусловлено способностью поверхностных структур и ДНК бактериальных клеток взаимодействовать с TLRs, причем это взаимодействие может приводить к неоднозначным последствиям, что в значительной мере зависит от штамма пробиотика. Так, показано, что бактерии *L. acidophilus*, *L. casei* и *L. delbrueckii* вызывали повышение содержания цитокинов Th1-типа (ФНО- α , интерферон- γ), а заметное повышение цитокинов Th2-типа (ИЛ-10, ИЛ-4) обнаруживали главным образом у животных, получавших *L. delbrueckii* и *L. casei* [3].

Таким образом, полученные нами результаты указывают, что пребывание здорового человека в искусственной среде обитания, моделирующей ряд факторов космического полета на Луну, оказало существенное влияние на состояние микрофлоры и систему TLRs клеток врожденного иммунитета. Наблюдаемые в эксперименте изменения продемонстрировали, что важным условием процесса адаптации при 120-суточной изоляции в гермообъекте является постоянное взаимодействие между клетками врожденного иммунитета и миллиардами сапрофитных и условно-патогенных микроорганизмов, окружающих и населяющих человеческий организм.

Дальнейшее накопление данных в этой области исследований будет способствовать формированию более полного представления о механизмах нарушений функционирования системы образ-распознающих рецепторов при длительном воздействии на организм человека экстремальных факторов среды обитания, а также разработке персонализированных подходов к использованию пробиотиков с целью профилактики и купирования негативных сдвигов в этой системе.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Belkaid Y., Hand T.W. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*. 2014; 157(1): 121–41. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.011>

2. Janeway C.A., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 2002; 20(1): 197–216. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>
3. Бондаренко В.М., Лиходед В.Г. Взаимодействие кишечной микрофлоры с Toll-подобными рецепторами в норме и патологии. *Медицинский вестник Юга России*. 2010; (1): 4–8.
4. Round J.L., Mazmanian S.K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2009; 9(5): 313–23. <https://doi.org/10.1038/nri2515>
5. Ильин В.К., Воложин А.И., Виха Г.В. *Колонизационная резистентность организма в изменённых условиях обитания*. М.: Наука; 2005.
6. Ильин В.К., Кирюхина Н.В. Синдром нарушения колонизационной резистентности человека в искусственной среде обитания и его профилактика. *Acta Naturae*. 2014; 6(2): 10–8.
7. Берендеева Т.А., Пономарев С.А., Антропова Е.Н., Рыкова М.П. Toll-подобные рецепторы клеток периферической крови космонавтов после длительных космических полётов на Международной космической станции. *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 2015; 49(6): 49–54.
8. Пономарев С.А., Берендеева Т.А., Калинин С.А., Муранова А.В. Состояние системы сигнальных образ-распознающих рецепторов моноцитов и гранулоцитов периферической крови космонавтов до и после длительных полётов на Международную космическую станцию. *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 2016; 50(5): 18–23. <https://doi.org/10.21687/0233-528X-2016-50-5-18-23>
9. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. *Практикум по микробиологии*. М.: Академия; 2005.
10. Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006; 124(4): 783–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
11. Kumar H., Kawai T., Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009; 388(4): 621–5. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.08.062>
12. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2001; 1(1): 135–45. <https://doi.org/10.1038/35100529>
13. Akira S., Takeda K. Toll-like receptor signaling. *Nat. Rev. Immunol.* 2004; 4(7): 499–511.
14. Hardy H., Harris J., Lyon E., Beal J., Foeys A.D. Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: Homeostasis and immunopathology. *Nutrients*. 2013; 5(6): 1869–912. <https://doi.org/10.3390/nu5061869>

REFERENCES

1. Belkaid Y., Hand T.W. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*. 2014; 157(1): 121–41. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.011>
2. Janeway C.A., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 2002; 20(1): 197–216. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>
3. Bondarenko V.M., Likhoded V.G. Interaction of intestinal microflora with toll-like receptors in health and pathology. *Meditsinskiy vestnik Yuga Rossii*. 2010; (1): 4–8. (in Russian)
4. Round J.L., Mazmanian S.K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2009; 9(5): 313–23. <https://doi.org/10.1038/nri2515>
5. Il'in V.K., Volozhin A.I., Vikha G.V. *Colonization Resistance of the Organism under Altered Habitat Conditions [Kolonizatsionnaya rezistentnost' organizma v izmenennykh usloviyakh obitaniya]*. Moscow: Nauka; 2005. (in Russian)
6. Il'in V.K., Kiryukhina N.V. Disruption of the colonization resistance syndrome in humans in altered habitats and its prevention. *Acta Naturae*. 2014; 6(2): 10–8. (in Russian)
7. Berendeeva T.A., Ponomarev S.A., Antropova E.N., Rykova M.P. Toll-like receptors in cosmonaut's peripheral blood cells after long-duration missions to the International space station. *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina*. 2015; 49(6): 49–54. (in Russian)

8. Ponomarev S.A., Berendeeva T.A., Kalinin S.A., Muranova A.V. Status of the system of signaling pattern recognition receptors of monocytes and granulocytes in cosmonauts' peripheral blood before and after long-duration missions to the International space station. *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina*. 2016; 50(5): 18–23. <https://doi.org/10.21687/0233-528X-2016-50-5-18-23> (in Russian)
9. Netrusov A.I., Egorova M.A., Zakharchuk L.M. *Tutorial on Microbiology [Praktikum po mikrobiologii]*. Moscow: Akademiya; 2005. (in Russian)
10. Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006; 124(4): 783–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>

Информация об авторах

Ильин Вячеслав Константинович[✉] — д.м.н., проф., зав. лаб. микробной экологии человека ИМБП РАН, Москва, Россия, piton2004@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3896-5003>

Орлов Олег Игоревич — д.м.н., акад. РАН, член Международной академии астронавтики, директор ИМБП РАН, Москва, Россия, SCOPUS ID: 7005642343

Рыкова Марина Петровна — д.м.н., в.н.с. лаб. физиологии иммунной системы ИМБП РАН, Москва, Россия), <https://orcid.org/0000-0002-9121-5351>

Комиссарова Дарья Валерьевна — к.б.н., с.н.с. лаб. питания, водообеспечения, гастроэнтерологии и гигиенического контроля физических факторов среды обитания ИМБП РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6374-4515>

Усанова Нонна Альбертовна — с.н.с. лаб. микробной экологии человека ИМБП РАН Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8485-4470>

Антропова Евгения Николаевна — к.б.н., с.н.с. лаб. физиологии иммунной системы ИМБП РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4681-7951>

Кутько Ольга Валерьевна — н.с. лаб. физиологии иммунной системы ИМБП РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5522-7777>

Калинин Сергей Алексеевич — к.б.н., с.н.с. лаб. физиологии иммунной системы ИМБП РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4424-7518>

Пономарёв Сергей Алексеевич — к.м.н., в.н.с., зав. лаб. физиологии иммунной системы ИМБП РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5364-7815>

Шеф Кирилл Александрович — м.н.с. лаб. питания, водообеспечения, гастроэнтерологии и гигиенического контроля физических факторов среды обитания ИМБП РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2651-7123>

Морозова Юлия Алексеевна — н.с., лаб. микробной экологии человека ИМБП РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/>

Сахарова Александра Витальевна — старший лаборант, лаб. микробной экологии человека ИМБП РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9642-7804>

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

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

Статья поступила в редакцию 30.10.2020;
принята к публикации 11.02.2021; опубликована 25.02.2021.

11. Kumar H., Kawai T., Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009; 388(4): 621–5. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.08.062>
12. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2001; 1(1): 135–45. <https://doi.org/10.1038/35100529>
13. Akira S., Takeda K. Toll-like receptor signaling. *Nat. Rev. Immunol.* 2004; 4(7): 499–511.
14. Hardy H., Harris J., Lyon E., Beal J., Foey A.D. Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: Homeostasis and immunopathology. *Nutrients*. 2013; 5(6): 1869–912. <https://doi.org/10.3390/nu5061869>

Information about the authors

Vyacheslav K. Ilyin[✉] — D. Sci. (Med.), Head, Laboratory of human microbial ecology, Institute of Biomedical Problems, Moscow, Russia, piton2004@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3896-5003>

Oleg I. Orlov — D. Sci. (Med.), Academician of the RAS, Member of the International Academy of Astronautics, Director, Institute of Biomedical Problems, Moscow, Russia, SCOPUS ID: 7005642343

Marina P. Rykova — D. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of physiology of the immune system, Institute of Biomedical Problems, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9121-5351>

Daria V. Komissarova — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of nutrition, water supply, gastroenterology and hygienic control of physical factors of the environment, Institute of Biomedical Problems, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6374-4515>

Nonna A. Usanova — senior researcher, Laboratory of human microbial ecology, Institute of Biomedical Problems, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8485-4470>

Eugenia N. Antropova — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of physiology of the immune system, Institute of Biomedical Problems, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4681-7951>

Olga V. Kutko — researcher, Laboratory of physiology of the immune system, Institute of Biomedical Problems, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5522-7777>

Sergey A. Kalinin — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of physiology of the immune system, Institute of Biomedical Problems, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4424-7518>

Sergey A. Ponomarev — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Head, Laboratory of physiology of the immune system, Institute of Biomedical Problems, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5364-7815>

Kirill A. Shef — junior researcher, Laboratory of nutrition, water supply, gastroenterology and hygienic control of physical factors of the environment, Institute of Biomedical Problems, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2651-7123>

Yulia A. Morozova — researcher, Laboratory of human microbial ecology, Institute of Biomedical Problems, Moscow, Russia, [https://orcid.org/0000-](https://orcid.org/0000-0000-0000-0000)

Alexandra V. Sakharova — senior laboratory technician, Laboratory of human microbial ecology, Institute of Biomedical Problems, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9642-7804>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

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

The article was submitted 30.10.2020;
accepted for publication 11.02.2020; published 25.02.2021.

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-29>

Генетическое типирование штаммов *Vibrio cholerae* биовара El Tor, выделенных на территории Кавказа в период 1970–1998 гг., с применением MLVA-5 и wgSNP

Ковалев Д.А.[✉], Шапаков Н.А., Писаренко С.В., Савельева И.В., Васильева О.В., Савельев В.Н., Сирица Ю.В., Жиров А.М., Ульшина Д.В., Кузнецова И.В., Бобрышева О.В., Куличенко А.Н.

Ставропольский противочумный институт, Ставрополь, Россия

Аннотация

Цель. Филогенетический анализ штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара El Tor, выделенных в разные годы на территории Кавказа, с использованием мультилокусного анализа числа варьируемых тандемных повторов (MLVA) и полногеномного анализа распределения единичных нуклеотидных полиморфизмов (wgSNP). **Материалы и методы.** Объектами исследования служили геномные последовательности 16 клинических штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor из коллекции Ставропольского противочумного института, выделенных на территории Кавказа с 1970 по 1998 г., а также 87 полногеномных последовательностей *V. cholerae* из базы данных NCBI. MLVA проводили по 5 VNTR-локусам. Полногеномное секвенирование осуществляли на платформе «Ion Torrent PGM».

Результаты. Исследуемые штаммы относятся к 15 MLVA-типам и делятся на 3 группы в составе одного кластера. Осуществлен анализ структуры основных островов вирулентности и патогенности, а также нуклеотидных полиморфизмов в генах *ctxB*, *tcpA* и *RstR*. Проведен филогенетический анализ штаммов на основе wgSNP-типирования, описаны SNP, специфичные для каждой филогенетической группы.

Заключение. Установлено поликлональное происхождение генетически измененных вариантов *V. cholerae* O1 биовара El Tor. Определено место штаммов *V. cholerae* биовара El Tor, выделенных с 1970 по 1998 г. на территории Кавказа, в глобальной популяции возбудителя. Показано, что в указанный период на территории Кавказа циркулировали штаммы, принадлежащие к 1-й и 2-й волнам 7-й пандемии холеры. Подтверждено, что случаи холеры на Кавказе являются завозными с территории эндемичных стран, определены наиболее вероятные источники инфекции.

Ключевые слова: полногеномное секвенирование, филогенетический анализ, *Vibrio cholerae*, MLVA, wgSNP

Для цитирования: Ковалев Д.А., Шапаков Н.А., Писаренко С.В., Савельева И.В., Васильева О.В., Савельев В.Н., Сирица Ю.В., Жиров А.М., Ульшина Д.В., Кузнецова И.В., Бобрышева О.В., Куличенко А.Н. Генетическое типирование штаммов *Vibrio cholerae* биовара El Tor, выделенных на территории Кавказа в период 1970–1998 гг., с применением MLVA-5 и wgSNP. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021; 98(1): 46–58. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-29>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-29>

Genetic typing of *Vibrio cholerae* strains biovar El Tor isolated from the Caucasus region during the 1970–1998 period using MLVA-5 and wgSNP

Dmitry A. Kovalev[✉], Nikolay A. Shapakov, Sergey V. Pisarenko, Irina V. Savel'eva, Oksana V. Vasil'eva, Vilory N. Savel'ev, Yulia V. Sirtsya, Andrey M. Zhiron, Diana V. Ul'shina, Irina V. Kuznetsova, Olga V. Bobrysheva, Aleksandr N. Kulichenko

Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia

Abstract

Aim. Our aim was to perform phylogenetic analysis of *Vibrio cholerae* O1 El Tor biovar strains, isolated from the Caucasus region over the years, using MLVA and wgSNP methods.

Materials and methods. We studied genomic sequences of 16 clinical *V. cholerae* O1 strains of El Tor biovar isolated on the territory of Caucasus from 1970 to 1998. These strains were obtained from the State Collection of Pathogenic Microorganisms of Stavropol Plague Control Research Institute. 87 whole genome sequences of *V. cholerae* strains, obtained from NCBI database, were also included in the analysis. MLVA-typing was carried out at 5 VNTR-loci. Whole genome sequencing was performed on Ion Torrent PGM platform.

Results. We determined that the studied strains belong to 15 MLVA-types and are divided in 3 groups of 1 cluster. We performed an analysis of the structure of the main virulence and pathogenicity islands, as well as nucleotide polymorphisms in *ctxB*, *tcpA*, *RstR* genes. We performed a wgSNP-based phylogenetic analysis of the strains, and described SNPs, specific for each phylogenetic group.

Conclusion. We confirmed the polyclonal origin of genetically modified variants of *V. cholerae* O1 biovar El Tor. We determined the place of *V. cholerae* strains of biovar El Tor, isolated from 1970 to 1998 on the territory of the Caucasus, in the global population of the pathogen. It is shown that during this period, strains belonging to the first and second waves of the seventh cholera pandemic circulated within the Caucasus. It was confirmed that cases of cholera in the Caucasus were imported from the territory of endemic countries, and the most probable sources of infection were identified.

Keywords: whole genome sequencing, phylogenetic analysis, *Vibrio cholerae*, MLVA, wgSNP

For citation: Kovalev D.A., Shapakov N.A., Pisarenko S.V., Savel'eva I.V., Vasil'eva O.V., Savel'ev V.N., Siritsa Yu.V., Zhironov A.M., Ul'shina D.V., Kuznecova I.V., Bobrysheva O.V., Kulichenko A.N. Genetic typing of *Vibrio cholerae* strains biovar El Tor isolated from the Caucasus region during the 1970–1998 period using MLVA-5 and wgSNP. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(1): 46–58. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-29>

Введение

Возбудитель холеры (*V. cholerae* O1, *ctxA*+) вызывает особо опасное острое инфекционное заболевание. Эпидемиологический надзор за холерой осуществляется в соответствии с Международными медико-санитарными правилами [1]. Согласно принятой классификации внутри вида *V. cholerae* выделяют 3 эпидемически опасных варианта: холерные вибрионы серогруппы O1 (биовары *classical* и El Tor) и O139.

Исторически выделяют 7 пандемий холеры: возбудителем первых шести считается *V. cholerae* классического биовара, но с 1961 г. произошла смена биовара на El Tor, явившийся причиной 7-й пандемии, продолжающейся до настоящего времени. Начиная с 1991 г. по всему миру распространились генетически измененные высокопатогенные геноварианты *V. cholerae* O1 биовара El Tor [2, 3].

Вспышки холеры, вызванные заносом инфекции, неоднократно фиксировались на территории Кавказа. Так, с начала 1970-х гг. в данном регионе было зарегистрировано несколько вспышек и эпидемий холеры: в 1970 г. — в Республике Дагестан, в 1985–1989 гг. — в Азербайджане, в 1990 г. — в Ставрополе, в 1994–1998 гг. — в Республике Дагестан [4–6].

Современные молекулярно-генетические методы исследования позволяют ретроспективно охарактеризовать геном штаммов возбудителя инфекции, вызвавших случаи заболевания холерой на различных территориях.

В последние годы для определения степени родства групп или отдельных штаммов *V. cholerae* [7–9] и типирования изолятов, выделенных как от людей во время вспышек, так и из объектов окружающей среды [10–12], широко применяется метод

мультилокусного анализа числа варибельных тандемных повторов (MLVA).

Один из актуальных методов генотипирования *V. cholerae* — определение единичных нуклеотидных полиморфизмов (SNP). При этом максимальную разрешающую способность демонстрирует полногеномный анализ распределения единичных нуклеотидных полиморфизмов (wgSNP) [13–17].

Безусловный научный интерес представляет изучение филогенетической принадлежности вариантов *V. cholerae* O1 биовара El Tor с последующим эволюционным и филогеографическим анализом.

Цель исследования — определение филогенетической принадлежности штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor, выделенных в разные годы на территории Кавказа.

Материалы и методы

В работе исследованы геномные последовательности 16 штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor из коллекции Ставропольского противочумного института, которые были изолированы из клинического материала во время эпидемических вспышек холеры на территории Кавказа с 1970 по 1998 г. Из них 7 — типичные *V. cholerae* биовара El Tor, выделенные в Республике Дагестан — 180Д (1970 г.); Азербайджане — 123Аз (1977 г.), 353Аз (1985 г.), 4017Аз (1989 г.); Ставрополе — С-347 (1980 г.), 454 (1990 г.); Краснодарском крае — 2278 (1987 г.). Остальные 9 — генетически измененные варианты *V. cholerae* биовара El Tor — выделены на территории Республики Дагестан — 157Д (1993 г.), 169Д (1993 г.), 1270Д (1994 г.), 17332 (1994 г.), 10213Д (1994 г.), 16241Д (1994 г.), 41Д (1998 г.); Краснодарского края — 286 (1994 г.); Ставропольского края — 8048 (1994 г.).

MLVA-типирование. Для типирования исследуемых штаммов возбудителя холеры использовали предложенную ранее схему MLVA-5 [10]. Для экстракции ДНК применяли набор реагентов «GeneJET Genomic DNA Purification Kit» («Thermo Scientific»). С помощью специфических праймеров в ПЦР нарабатывали продукты амплификации по 5 локусам для каждого из 16 штаммов. ПЦР проводили с использованием амплификатора «Терцик» («ДНК-Технология»), анализ ампликонов — путем капиллярного электрофореза с помощью анализатора «ABI Prism 3500» («Applied Biosystems»). Для оценки вариабельности локусов использовали индекс разнообразия Хантера–Гастона [18].

При проведении кластерного анализа в качестве группы сравнения использовали доступные MLVA-генотипы штаммов *V. cholerae*, выделенных в Индии, Бангладеш, на Гаити. Кластерный анализ на основе данных MLVA выполняли с использованием программного пакета «BioNumerics v7.6» («Applied Maths»). Минимальное остовное дерево было построено на основе количества tandemных повторов с использованием категориального коэффициента дистанции.

Полногеномное секвенирование. Подготовку геномных библиотек проводили с использованием набора «Ion Xpress Plus Fragment Library Kit» («Life Technologies»), моноклональную амплификацию выполняли на микросферах — набор «Ion OneTouch 400 Template Kit» («Life Technologies») в соответствии с протоколами производителя. Секвенирование геномов осуществляли на секвенаторе «Ion Torrent PGM» и чипах «Ion 316 Chips Kit v2» («Life Technologies»).

Анализ геномов штаммов *V. cholerae*. Оценку качества полученных прочтений проводили с помощью программы «FastQC v0.11.3» [19]. Прочтения, содержащие нуклеотиды с низким значением качества, были отфильтрованы в программе «Trimmomatic v0.33» [20]. Прочтения со средним значением качества $Q < 15$ баллов, а также прочтения длиной < 75 нуклеотидов были удалены. Сборку геномов проводили в программном обеспечении «Newbler v3.0» («Roche»). Качество сборки геномов оценивали с использованием программы «Quast 3.0» [21], геномную последовательность штамма *V. cholerae* O1 El Tor N16961 (GenBank: GCF_000006745.1) использовали для определения точности и эффективности сборки. Аннотацию геномов выполняли с помощью NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline.

Для описания филогенетического контекста исследуемых изолятов использовали 87 полногеномных последовательностей *V. cholerae* из общедоступной базы данных NCBI¹.

Поиск SNP проводили в гомологичных регионах нуклеотидных последовательностей в онлайн-версии программы «REALPHY v1.10» [22]. Повторяющиеся и паралогичные последовательности были удалены в процессе множественного выравнивания с помощью алгоритма программы. Обнаруженные SNP были извлечены в файл VCF, после чего SNP, расположенные ближе чем 10 п.н. друг от друга, были отфильтрованы и удалены. Поиск SNP, отличающих близкородственные штаммы друг от друга, а также специфичных для отдельных групп штаммов, осуществляли среди SNP, прошедших фильтрацию с использованием собственных скриптов в программном обеспечении R.

Для филогенетической реконструкции на основе wgSNP-анализа штаммов *V. cholerae* применяли пакет программ «BEAST v2.3.0»². Для определения параметров эволюционной модели тестировали 88 различных моделей замещения на матрице множественного выравнивания геномов (коровый геном) в программе «Jmodeltest2». Оптимальную модель нуклеотидных замен выбирали на основе значений байесовского информационного критерия.

Поиск генов, кодирующих факторы вирулентности, и генов устойчивости к антибактериальным препаратам, проводили при помощи программного обеспечения «ABRicate v.0.8.13»³.

Результаты

При анализе фенотипических свойств установлено, что исследуемые штаммы относятся к токсигенным и гемолизотрицательным. Штаммы, изолированные до 1993 г., способны лизироваться бактериофагами ХДФ 3, ХДФ 4, ХДФ 5 и El Tor. В то же время изоляты, выделенные позднее, не обладают указанным свойством.

Анализ полученных данных MLVA-5 позволил установить, что 16 штаммов *V. cholerae* биовара El Tor представлены 15 MLVA-типами (табл. 1). При этом 7 изученных типичных штаммов *V. cholerae* биовара El Tor принадлежат к 7 MLVA-типам, а 9 генетически измененных штаммов — к 8 различным MLVA-типам. Только 2 штамма геновариантов El Tor были отнесены к одному MLVA-типу (9-7-8-15-20): штамм 157Д, выделенный в 1993 г., и штамм 7332, выделенный в 1994 г. Это свидетельствует о заносе холеры из очага, существующего за пределами Республики Дагестан, в течение 2 лет. В целом полученные данные свидетельствуют о значительной вариабельности геномов обеих групп.

В результате проведенного MLVA-типирования выявлены 3 аллели для локусов I хромосомы и 6–9 аллелей для II хромосомы. Индекс разнообразия Хантера–Гастона был $> 0,99$. При этом для ло-

¹ National Center for Biotechnology Information. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

² URL: <https://www.beast2.org>

³ URL: <https://github.com/tseemann/abricate>

Таблица 1. MLVA-профили штаммов *V. cholerae* O1 биовара EI Tor
Table 1. MLVA profiles of *V. cholerae* strains O1 biovar EI Tor

№ No.	Штамм Strain	Место и год выделения Location and year of isolation	Число повторов в MLVA-локусе Number of repeats in the MLVA locus				
			I хромосома / I chromosome			II хромосома / II chromosome	
			VC147 (белок FtsY) (protein FtsY)	VC437 (межгенная область) (intergenic region)	VC1650 (коллагеназа) (collagenase)	VCA171 (гипотетический белок) (hypothetical protein)	VCA283 (гипотетический белок) (hypothetical protein)
1	180Д 180D	Республика Дагестан, 1970 Republic of Dagestan, 1970	9	6	7	15	26
2	123А3 123Az	Республика Азербайджан, 1977 Republic of Azerbaijan, 1977	10	7	7	18	28
3	353А3 353Az	Республика Азербайджан, 1985 Republic of Azerbaijan, 1985	10	7	7	20	31
4	4017А3 4017Az	Республика Азербайджан, 1989 Republic of Azerbaijan, 1989	10	6	8	15	18
5	С-347 C-347	Ставрополь, 1980 Stavropol, 1980	9	7	7	20	23
6	454	Ставрополь, 1990 Stavropol, 1990	10	6	8	24	20
7	2278	Краснодар, 1987 Krasnodar, 1987	11	7	8	20	16
8	286	Краснодар, 1994 Krasnodar, 1994	9	7	8	15	21
9	1270Д 1270D	Республика Дагестан, 1994 Republic of Dagestan, 1994	10	7	8	15	22
10	157Д 157D	Республика Дагестан, 1993 Republic of Dagestan, 1993	9	7	8	15	20
11	169Д 169D	Республика Дагестан, 1993 Republic of Dagestan, 1993	9	7	7	15	20
12	8048	Кисловодск, 1994 Kislovodsk, 1994	10	7	8	28	–
13	10213Д 10213D	Республика Дагестан, 1994 Republic of Dagestan, 1994	9	7	8	15	23
14	16241Д 16241D	Республика Дагестан, 1994 Republic of Dagestan, 1994	9	7	7	17	21
15	17332	Республика Дагестан, 1994 Republic of Dagestan, 1994	9	7	8	15	20

Типичные холерные вибрионы / Typical cholera vibrios

Генетически измененные варианты / Genetically modified variants

Окончание табл. 1.

End of Table 1.

№ No.	Штамм Strain	Место и год выделения Location and year of isolation	Число повторов в MLVA-локусе Number of repeats in the MLVA locus				
			I хромосома / I chromosome			II хромосома / II chromosome	
			VC147 (белок FtsY) (protein FtsY)	VC437 (межгенная область) (intergenic region)	VC1650 (коллагеназа) (collagenase)	VCA171 (гипотетический белок) (hypothetical protein)	VCA283 (гипотетический белок) (hypothetical protein)
16	41Д 41D	Республика Дагестан, 1998 Republic of Dagestan, 1998	9	8	8	15	22
17	569В	Индия, 1948 India, 1948	10	4	3	16	34
18	868	Индия, 1964 India, 1964	8	6	8	14	35
19	178	Индия, 2006 India, 2006	9	3	6	19	17
20	200	Индия, 2006 India, 2006	9	3	6	22	19
21	236	Индия, 2007 India, 2007	9	3	6	17	16
22	350	Индия, 2007 India, 2007	10	6	7	15	19
23	AR32732	Бангладеш, 2004 Bangladesh, 2004	9	3	6	22	12
24	MQ1795	Бангладеш, 2001 Bangladesh, 2001	9	3	6	16	11
25	MJ1236	Бангладеш, 1994 Bangladesh, 1994	8	7	8	12	19
26	MG116926	Бангладеш, 1991 Bangladesh, 1991	8	7	8	14	23
27	HC1037	Гаити, 2014 Haiti, 2014	7	3	6	14	8

кусов I хромосомы он варьировал в диапазоне 0,65–0,68, для локусов II хромосомы — 0,88–0,95, что свидетельствует об относительно высоком уровне стабильности первых хромосомных локусов. Полученные данные подтверждают результаты, описанные ранее [23–26].

Анализ построенной дендрограммы на основе MLVA-типирования по 5 вышеназванным локусам выявил деление всех штаммов на 2 кластера (рис. 1).

Первый кластер образован только генетически измененными штаммами, выделенными в Бангладеш в 2001 и 2004 гг. и в Индии в 2006 и 2007 гг. Сопоставление MLVA-генотипов указанных штаммов (табл. 1) показывает, что они различаются только по числу повторов 2 вариабельных локусов II хромосомы. При этом аллельные варианты VNTR

I хромосомы были идентичны (9-3-6), что говорит об общем происхождении изолятов. Также в этом субкластере отдельно расположен штамм из Гаити с аллельным профилем 7-3-4-14-8, что соответствует установленному происхождению холеры в Гаити из региона Непала [27]. Эти данные позволяют отметить продолжающиеся эволюционные изменения генома новых вариантов возбудителя холеры.

Во втором кластере можно выделить 3 группы: в первую вошли штаммы, выделенные в Республике Дагестан в 1970, 1993, 1994, 1998 гг., а также штаммы, изолированные в Краснодаре в 1987 и 1994 гг.

Вторую группу составили изоляты, выделенные в Республике Дагестан, Ставропольском крае (Кисловодск), Республике Азербайджан в 1989–1994 гг. Отдельное положение в группе занимает штамм 569В классического биотипа, выделенный в

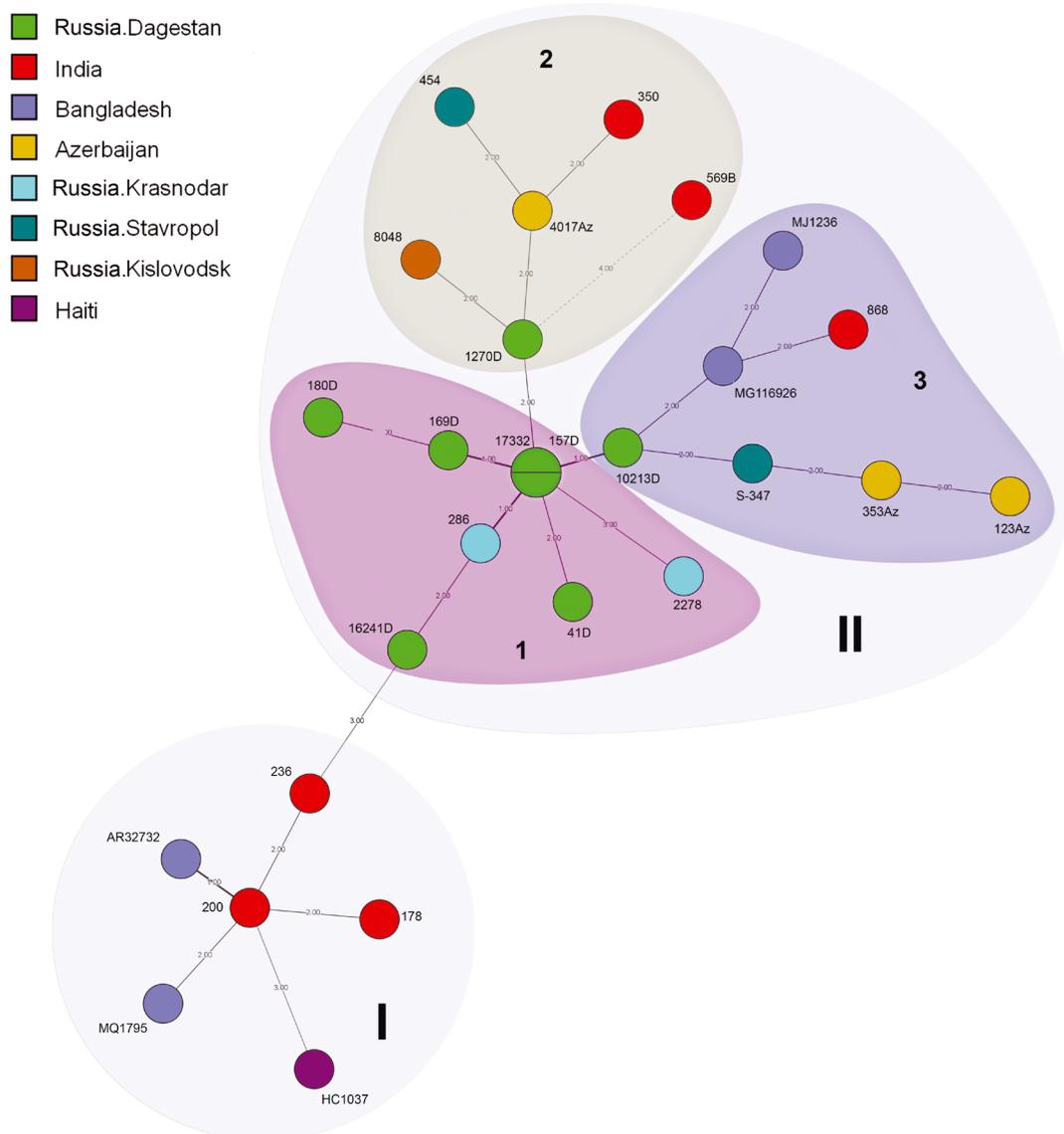


Рис. 1. Кластерный анализ на основе MLVA-типирования штаммов *V. cholerae* с использованием категориального коэффициента дистанции (программный пакет «BioNumerics v7.6»).

Римскими цифрами обозначены основные кластеры, арабскими — субкластеры в структуре кластера II.

Fig. 1. Cluster analysis based on MLVA typing of *V. cholerae* strains using the categorical distance coefficient (BioNumerics v7.6).

Roman numerals indicate the main clusters, arabic numerals indicate the subclusters in the structure of cluster II.

Индии в 1948 г. Штаммы, выделенные в Республике Азербайджан в 1989 г. и в Ставропольском крае (Ставрополь) в 1990 г., являются типичными холерными вибрионами биовара El Tor и имеют сходные MLVA-профили (10-6-8-15-18/10-6-8-24-20), что подтверждает клональное происхождение штаммов. Близкородственность генетически измененного штамма 350 из Индии, выделенного в 2007 г., и типичного штамма *V. cholerae* биовара El Tor, изолированного в Республике Азербайджан в 1989 г., свидетельствует о том, что вариабельность MLVA-генотипов не ассоциирована с изменениями генома, приводящими к формированию гибридных вариантов биовара El Tor.

Третья группа: штаммы, выделенные в Республике Дагестан в 1994 г., в Индии в 1964 г., в Бангладеш в 1991 и 1994 гг., а также в Ставропольском крае (Ставрополь, 1980 г.). Относительно генетически измененного штамма, выделенного в Республике Дагестан в 1994 г., можно предположить его происхождение из Бангладеш. Этот факт подтверждается тем, что MLVA-генотип штамма отличается 2 локусами от штамма MG1236, выделенного в Бангладеш в 1991 г. Штаммы, изолированные на территории Республики Азербайджан в 1977 и 1985 гг. в 3-й группе, различаются по количеству повторов в 2 вариабельных локусах II хромосомы. В то же время аллельный вариант ло-

кусов I хромосомы был идентичен (10-7-7/10-7-7), что позволило выделить их в отдельный кластерный комплекс.

В результате секвенирования *de novo* были получены незавершенные геномы со средним покрытием 76–105×, включающие от 91 до 169 контигов (>500 п.н.) Общий размер сборки геномов секвенированных штаммов составил от 3 877 025 до 4 103 351 п.н. (табл. 2).

У каждого анализируемого штамма обнаружено 47 общих генов вирулентности, а также 2–7 гена устойчивости к антибактериальным препаратам (*varG*, *dfrA1*, *catB9*, *aadA1*, *sul1*, *sul2*, *floR*, *tet(A)*, *aph(6)-ld* и *aph(3'')-ld*): карбапенемам, триметоприму, хлорамфениколу, стрептомицину, сульфонамидам, тетрациклинам.

Данные wgSNP позволили определить, что острова вирулентности (VPI-I и VPI-II) и патогенности (VSP-I и VSP-II), а также профаговая область CTX присутствуют в геномах всех исследуемых штаммов. При этом в структуре и нуклеотидных последовательностях данных областей установлены различия при сравнении с референсной последовательностью *V. cholerae* N16961.

Остров патогенности VPI-I всех исследуемых штаммов возбудителя холеры содержал несинони-

мичную SNP в гене *VC0817*, кодирующем транспозазу, в позиции *A937G*.

При анализе структуры острова патогенности VSP-I показана его 100% гомология по всем локусам с референсным геномом, кроме SNP в гене *VC0180* (гипотетический белок) в позиции *C1003T* у всех генетически измененных штаммов. Данная мутация характерна исключительно для штаммов, выделенных после 1990 г.

Анализ структурной организации VSP-II (локусы VC0490-516) позволил установить наличие у штаммов 41D, 169D и 1270D общей делеции, включающей ген *VC513*. При сравнении исследуемых геномов с референсным идентичность нуклеотидной последовательности VSP-II для указанных 3 штаммов составила 97,1–97,2 и 99,9% — для остальных штаммов. При этом у всех генетически измененных вариантов *V. cholerae* биовар El Tor отмечена SNP в позиции *C526T* в гене *VC496* (гипотетический белок). Кроме того, в геноме 7 штаммов из 10, выделенных в 1990-х гг., идентифицирована SNP в гене *VC0513* в позиции *T71C* (Helix-turn-helix transcriptional regulator — *RstR*). Следует отметить, что указанная мутация в гене *VC0513* несинонимична и приводит к замене треонина на изолейцин.

Таблица 2. Результаты полногеномного анализа

Table 2. Results of genome-wide analysis

№ No.	Штамм Strain	Число контигов The number of contigs	Длина генома, п.н. The length of genome, b.p.	GC, %	Всего генов Total number of genes	GenBank ID
1	180D	130	3906916	47,5	3666	GCA_004358215.1
2	123Az	120	3919566	47,5	3690	GCA_004358225.1
3	353Az	128	3953109	47,5	3660	GCA_009728505.1
4	4017Az	124	3907443	47,5	3594	GCA_009728295.1
5	C-347	125	3945425	47,5	3652	GCA_009728405.1
6	454	136	3893896	47,5	3572	GCA_009728525.1
7	2278	167	3877025	47,5	3544	GCA_009728225.1
8	157D	138	4078639	47,5	3843	GCA_004358245.1
9	169D	119	4102946	47,4	3936	GCA_003130485.1
10	1270D	133	4016316	47,5	3794	GCA_003130495.1
11	17332	144	4031067	47,4	3697	GCA_009728345.1
12	10213D	147	4020493	47,4	3487	GCA_003327445.1
13	16241D	141	4081404	47,5	3891	GCA_003130465.1
14	41D	140	4038688	47,5	3862	GCA_003130475.1
15	286	169	4068702	47,5	3802	GCA_004358285.1
16	8048	91	4103351	47,4	3823	GCA_009728375.1

Примечание. GC — доля гуанина (G) и цитозина (C) среди всех нуклеотидных остатков.

Note. GC — the proportion of guanine (G) and cytosine (C) among all nucleotide residues.

Последовательность острова VSP-II в геноме штамма *V. cholerae* 2278 (Краснодар, 1987 г.) содержит 34 SNP, в том числе 12 в составе гена *VC494* (гипотетический белок), 7 — *VC496* (гипотетический белок), 7 — *VC498* (рибонуклеаза H), 8 — *VC506* (гипотетический белок).

Дальнейший анализ показал, что аллель гена *ctxB* субъединицы холерного токсина штаммов, выделенных в период с 1970 по 1990 г., принадлежит к типу El Tor (*ctxB3*). Для других штаммов выборки характерно наличие ранее описанных SNP в позициях 115 и 203 гена *ctxB*, соответствующих аллелю *ctxB1* [28].

Последовательность гена *tcpA* всех исследуемых штаммов была идентична и соответствовала референсному геному.

При сравнительном анализе структуры генов, кодирующих факторы патогенности, выявлен

ряд несинонимичных замен; в частности, в геноме штамма 157D в гене *VC0983* (регуляторный белок ToxS) в позиции *A117G*; 2278 — *VC0984* (белок-активатор холерного токсина) в позиции *G410T*; 454 — *VC0984* (белок-активатор холерного токсина) в позиции *G21T*. У всех изучаемых генетически изменённых штаммов и 2 типичных *V. cholerae* O1 El Tor (454, 2278) идентифицирован SNP в гене *VC1318* (белок наружной мембраны OmpV) в позиции *G242T*. Также ДНК штамма C-347 содержит SNP в кластере *RTX* гена *VC1451*, кодирующего RtxA, в позиции *C1480T*.

Далее с целью определения филогенетических связей и регионов происхождения изолятов, выделенных на Кавказе, проведена филогенетическая реконструкция на основе wgSNP 103 геномов *V. cholerae*, изолированных в период 7-й пандемии (с 1937 по 2017 г.) на территории 23 стран (Аргентина, Бахрейн,

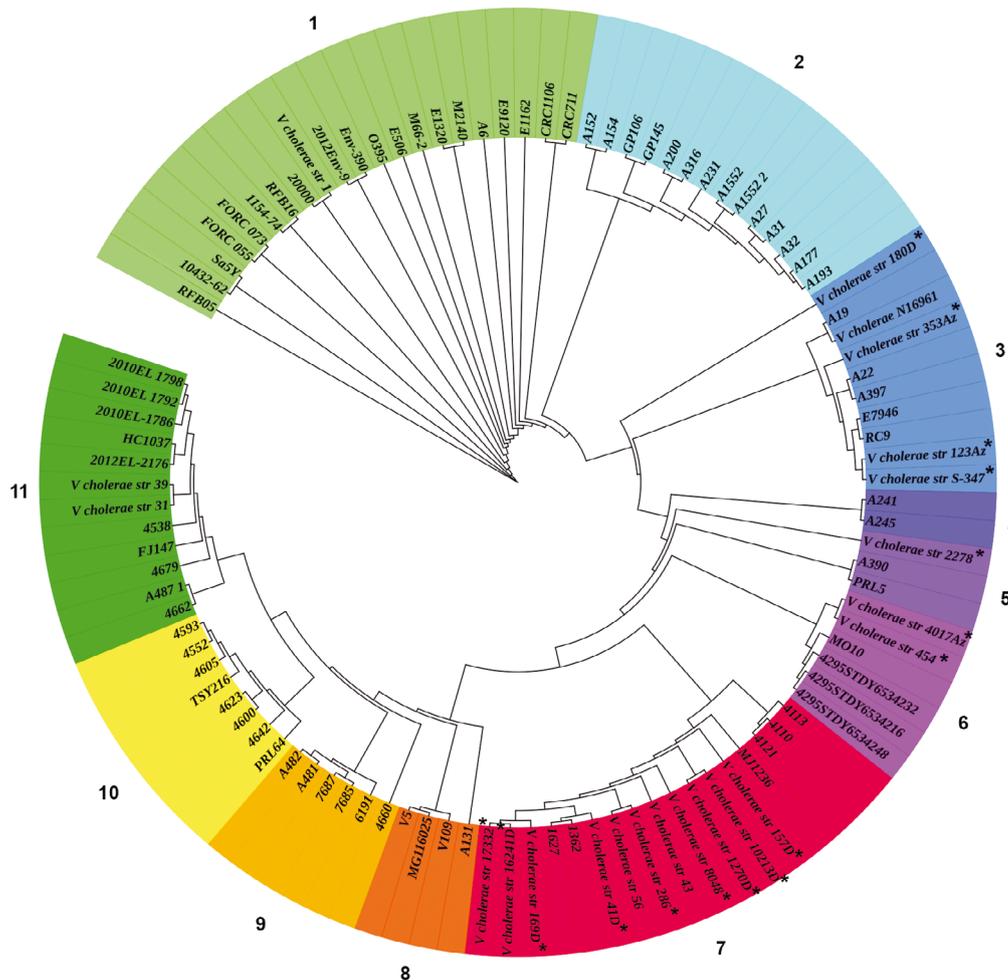


Рис. 2. Филогенетическое дерево на основе wgSNP-типирования штаммов *V. cholerae*, построенное с помощью «BEAST v2.3.0» с использованием строгих часов и модели замещения нуклеотидов GTR.

Цветом и цифрами 1–11 обозначены филогенетические группы. Звездочкой отмечены штаммы, геномы которых были секвенированы в рамках данного исследования.

Fig. 2. Phylogenetic tree based on wgSNP typing of *V. cholerae* strains, constructed using BEAST v2.3.0 using strict clocks and the GTR nucleotide substitution model.

The color and numbers 1–11 indicate phylogenetic groups. Asterisk indicates the strains whose genomes were sequenced in this study.

Бангладеш, Боливия, Китай, Колумбия, Джибути, Германия, Гаити, Индия, Индонезия, Кения, Мексика, Мозамбик, Перу, Филиппины, Россия, Южная Корея, Таиланд, Украина, США, Вьетнам).

Филогенетический анализ на основе wgSNP-типирования выявил деление изучаемых штаммов *V. cholerae* на 11 филогенетических групп (клад) (рис. 2).

К 1-й группе принадлежат штаммы классического *V. cholerae*, выделенные в постпериод 6-й пандемии холеры, содержащие на 2-й хромосоме 2 специфических SNP (921847 и 1024057). Данные штаммы по своим морфогенетическим свойствам соответствуют референсному штамму классического биотипа 0395 и выделены в США (1962, 1974, 2004, 2017 гг.), Южной Корее (2014, 2017 гг.), на Гаити (2012 г.), в Индии (1962, 1964, 1974 г), Индонезии (1937, 1957, 1961 г.), Китае (1962, 1964 гг.), Австралии (1977 г.).

Группа 2 включает штаммы *V. cholerae* El Tor *ctxA+*, *ctxB3*, изолированные в Мозамбике (1991 г.), Германии (1975 г.), Индии (1979 г.), Аргентине (1992, 1993 гг.), Мексике (1991 г.), Перу (1991, 1992 гг.), США (1992 г.), Колумбии (1992 г.), Боливии (1992 г.), содержащие специфические SNP на I и II хромосомах в позициях 775458 и 111100 соответственно. В эти годы завозов или заносов холеры из указанных стран на территорию Кавказа не зафиксировано.

Группа 3 представлена штаммами *V. cholerae* El Tor *ctxA+*, *ctxB3*, не содержащими специфические SNP и выделенными в Бангладеш (1971, 1979, 1987 гг.), Бахрейне (1978 г.), Кении (1985 г.). В эту же группу вошли штаммы, изолированные в Дагестане (1970 г.), Азербайджане (1977 г.), Ставропольском крае (1980 г.) и референсный штамм 16961, что свидетельствует о близком родстве данной группы штаммов, а также позволяет предполагать завоз холеры на Кавказ из перечисленных выше эндемичных по холере стран.

Группа 4 состоит из 2 штаммов *V. cholerae* El Tor — *ctxA+*, *ctxB3*, выделенных во Вьетнаме (1989 г.) и содержащих специфические полиморфизмы на I (4 SNP) и II (2 SNP) хромосомах. Штаммы *V. cholerae*, выделенные на территории Кавказа, с подобной характеристикой не обнаружены.

Группа 5 представлена 3 штаммами *V. cholerae* El Tor *ctxA+*, *ctxB3*, не содержащими специфические SNP, выделенными в Бангладеш (1987 г.), Индии (1980 г.), и филогенетически родственным им штаммом возбудителя холеры, обнаруженным в Сочи (Россия, 1987 г.), что было подтверждено при эпидемиологическом расследовании случая заражения туристки, прибывшей в Сочи из Бангладеш.

В группу 6 вошли штаммы *V. cholerae* El Tor *ctxA+*, *ctxB3*, содержащие специфические SNP на I и II хромосомах, выделенные как в Бангладеш (2013,

2014 гг.) и Индии (1992 г.), так и в Азербайджане (1989 г.) и Ставрополе (1990 г.), что свидетельствует о близком генетическом родстве данных микроорганизмов. Эпидемиологически подтвержден завоз в Азербайджан в 1989 г. и в Ставрополь в 1990 г. холеры, возбудитель которой имел генетические свойства *V. cholerae*, обнаруженных в Бангладеш и Индии.

Группа 7 представлена штаммами *V. cholerae* El Tor *ctxA+*, *ctxB1*, т.е. генетически измененными вариантами *V. cholerae* биовара El Tor, содержащими специфические SNP на I и II хромосомах, выделенными с 1995 по 2005 г. (2-я волна распространения 7-й пандемии холеры).

Группа 8 включает штаммы *V. cholerae* El Tor *ctxA+*, *ctxB3*, выделенные в Бангладеш и Индии в 1989–1991 гг., что свидетельствует о близком родстве с группой 3 штаммов *V. cholerae* El Tor *ctxA+*, *ctxB3*.

В состав групп 9–11 входят штаммы, изолированные в период с 2001 по 2017 г. и являющиеся представителями 3-й волны 7-й пандемии. Для штаммов группы 9, выделенных на территории Африки и Индийского полуострова (Кения, Джибути, Индия и Бангладеш), найдено 3 специфических SNP.

Примечательно, что штаммы из группы 10 были выделены в основном на территории Индии в 1992–2007 гг., а штамм TSY216 — в Таиланде в 2010 г., что может свидетельствовать о заносе *V. cholerae* на территорию этой страны из Индии. Для штаммов указанной группы специфических SNP не обнаружено.

Группа 11 состоит из штаммов, выделенных на территории Гаити, Китая, Бангладеш и Украины. Штаммы данной группы содержат 2 специфических SNP, локализованные на I хромосоме.

Анализ нуклеотидных замен в геномах штаммов *V. cholerae* выявил 1157 SNP, большая часть которых относительно равномерно распределена на I хромосоме (табл. 3).

Заключение

Проведенное MLVA-типирование 16 штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor — как типичных, так и генетически измененных вариантов, выделенных от больных людей в разные периоды 7-й пандемии холеры, показало, что исследуемые штаммы относятся к 15 MLVA-типам и делятся на 3 группы в составе одного кластера. В то же время другой кластер образован только генетически измененными штаммами, использованными в качестве группы сравнения и изолированными после 2000 г. в Бангладеш (2001, 2004 гг.), Индии (2006 и 2007 гг.) и на Гаити (2014 г.). Принадлежность исследуемых штаммов к 15 разным MLVA-типам свидетельствует о продолжающихся эволюционных изменениях генома возбудителя холеры, что согласуется с данными, полученными ранее [25, 29].

Таблица 3. Специфичные SNP в геноме различных групп *V. cholerae*, выделенных на Кавказе в период 6-й и 7-й пандемий

Table 3. Specific SNPs in the genome of various *V. cholerae* groups isolated in the Caucasus during the 6th and 7th pandemics

№ группы Group No.	Число специфичных SNP Number of specific SNPs	Хромосома, координаты SNP Chromosome, coordinates of the SNP	Ген/локус Gene/locus	Белок/локус Protein/locus
1	2	2 (921847)	VCA0975	АТФ-связывающий белок ATP-binding protein
		2 (1024057)	VCA1073(<i>putA</i>)	Бифункциональная пролиндегидрогеназа Bifunctional proline dehydrogenase
2	2	1 (775458)	VC0722(<i>ppx</i>)	Экзополифосфатаза Exopolyphosphatase
		2 (111100)	VCA0103	Белок-переносчик неорганических анионов семейства SulP SulP family inorganic anion transporter
3	0	–	–	–
4	6	1 (1720436)	VC1606	Белок семейства TolC TolC family protein
		1 (2285964)	VC2132(<i>fliG</i>)	Белок переключателя жгутиков FliG Flagellar motor switch protein FliG
		1 (2695072)	VC2506(<i>rapA</i>)	Связанный с РНК-полимеразой белок RNA polymerase-associated protein
		1 (2801737)	VC2630	Белок семейства PilQ Type IV pilus secretin PilQ family protein
		2 (52695)	VCA0044	Псевдоген Pseudogen
2 (118960)	VCA0109(<i>tssE</i>)	Субъединица системы секреции TssE Secretion system baseplate subunit TssE		
5	0	–	–	–
6	2	1 (2766100)	VC2599(<i>mr</i>)	Рибонуклеаза R Ribonuclease R
		2 (636413)	VCA0697	Дигуанилатциклаза, сенсорный домен Sensor domain-containing diguanylate cyclase
7	6	1 (1317870)	<i>Intergenic</i>	Межгенное пространство Intergenic space
		1 (1830897)	VC1697	NAD(P)H-связывающий белок NAD(P)H-binding protein
		2 (58725)	VCA0051	Гипотетический белок Hypothetical protein
		2 (62339)	VCA0055	Белок, содержащий домен Domain-containing protein
		2 (487649)	VCA0550	Белок семейства site-2 протеаз Site-2 protease family protein
2 (796722)	VCA0849	Белок, содержащий модуль сдерживания Retention module-containing protein		
8	0	–	–	–
9	3	1 (89430)	VC0091	SAM-зависимая метилтрансфераза SAM-dependent methyltransferase
		1 (2336676)	VC2190(<i>flgL</i>)	Белок FlgL, связанный с жгутиками Flagellar hook-associated protein FlgL
		1 (2690901)	VC2503	Валин-тРНК лигаза Valine-tRNA ligase
10	0	–	–	–
11	2	1 (2424759)	VC2270	Рибофлавинсинтаза Riboflavin synthase
		1 (2669927)	VC2489	Регулятор транскрипции семейства TetR/AcrR TetR/AcrR family transcriptional regulator

Кроме того, данные MLVA-типирования подтвердили, что случаи холеры на Кавказе являются завозными с территории эндемичных стран и позволили определить наиболее вероятные источники инфекции, что важно для молекулярно-эпидемиологического мониторинга за возбудителем холеры.

Основываясь на полученных данных wgSNP и анализа структурных особенностей геномов, установлено место штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor, выделенных в период с 1970 по 1998 г. на территории Кавказа, в глобальной популяции *V. cholerae*. Показано, что в указанный период на Кавказе циркулировали штаммы, принадлежащие 1-й и 2-й волнам 7-й пандемии холеры.

С использованием wgSNP выявлены ранее не описанные несинонимичные SNP в генах, ассоциированных с экспрессией факторов патогенности, которые могут в дальнейшем быть использованы в качестве дополнительных генетических маркеров для характеристики изолятов *V. cholerae* O1 биовара El Tor.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- ВОЗ. Международные медико-санитарные правила (2005 г.). Available at: https://www.who.int/ihr/IHR_2005_ru.pdf
- Ramamurthy T., Mutreja A., Weill F.X., Das B., Ghosh A., Nair G.B. Revisiting the global epidemiology of cholera in conjunction with the genomics of *Vibrio cholerae*. *Front. Public Health*. 2019; 7: 203. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00203>
- Greig D.R., Schaefer U., Octavia S., Hunter E., Chattaway M.A., Dallman T.J., et al. Evaluation of whole-genome sequencing for identification and typing of *Vibrio cholerae*. *J. Clin. Microbiol.* 2018; 56(11): e00831–18. <https://doi.org/10.1128/JCM.00831-18>
- Москвитина Э.А., Тюленева Е.Г., Кругликов В.Д., Титова С.В., Водопьянов А.С., Куриленко М.Л. и др. Холера: оценка эпидемиологической обстановки в мире и России в 2008–2017 гг. Прогноз на 2018 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018; (1): 36–43. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2018-1-36-43>
- Харченко Г.А., Кимирилова О.Г., Буркин В.С. Эпидемиология и клиника холеры 1970 года в Астраханской области. *Детские инфекции*. 2019; 18(1): 51–5. <https://doi.org/10.22627/2072-8107-2019-18-1-51-55>
- Онищенко Г.Г., Москвитина Э.А., Водопьянов А.С., Монахова Е.В., Писанов Р.В., Водопьянов С.О. и др. Ретроспективный молекулярно-эпидемиологический анализ эпидемии холеры в Республике Дагестан в 1994 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; (4): 33–41. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-4-33-41>
- Челдышова Н.Б., Крицкий А.А., Лозовский Ю.В., Гусева Н.П. Сравнительный MLVA-анализ штаммов *Vibrio cholerae* классического биовара, выделенных в России и за рубежом. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; (4): 88–92. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-4-88-92>
- George C.M., Rashid M., Almeida M., Saif-Ur-Rahman K.M., Monira S., Bhuyian M.S.I., et al. Genetic relatedness of *Vibrio cholerae* isolates within and between households during outbreaks in Dhaka, Bangladesh. *BMC Genomics*. 2017; 18(1): 903. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4254-9>
- Kachwamba Y., Mofham A.A., Lukupulo H., Urio L., Majigo M., Moshaf F., et al. Genetic characterization of *Vibrio cholerae* O1 isolates from outbreaks between 2011 and 2015 in Tanzania. *BMC Infect. Dis.* 2017; 17(1): 157. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2252-9>
- Garrine M., Mandomando I., Vubil D., et al. Minimal genetic change in *Vibrio cholerae* in Mozambique over time: multilocus variable number tandem repeat analysis and whole genome sequencing. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2017; 11(6): e0005671. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005671>
- Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Олейников И.П., Мишанькин Б.Н. INDEL-типирование штаммов *Vibrio cholerae*. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2017; 22(4): 195–200. <https://doi.org/10.18821/1560-9529-2017-22-4-195-200>
- Водопьянов А.С., Мазрухо А.Б., Водопьянов С.О., Мишанькин Б.Н., Кругликов В.Д., Архангельская И.В. и др. VNTR-генотипирование штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных из объектов внешней среды на территории Российской Федерации в 2012 году. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2014; 91(2): 46–51.
- Селянская Н.А., Архангельская И.В., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Кругликов В.Д., Водяницкая С.Ю. и др. Типирование штаммов *Vibrio cholerae* не O1/не O139, изолированных в Ростовской области в 2014 году. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2016; 93(1): 3–9. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2016-1-3-9>
- Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Олейников И.П., Мишанькин Б.Н., Кругликов В.Д., Архангельская И.В. и др. INDEL- и VNTR-типирование штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных в 2013 году из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации. *Здоровье населения и среда обитания*. 2015; (5): 41–4.
- Van Boeckel T.P., Brower C., Gilbert M., Grenfell B.T., Levin S.A., Robinson T.P., et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015; 112(18): 5649–54. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
- Сизова Ю.В., Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Черепихина И.Я., Бурлакова О.С. Фенотипический и генотипический анализ токсинопродукции типичных и атипичных штаммов холерных вибрионов в стрессовых условиях окружающей среды. *Современные проблемы науки и образования*. 2017; (3): 141.
- Челдышова Н.Б., Смирнова Н.И., Заднова С.П., Краснов Я.М., Крицкий А.А., Буаро М.И. и др. Молекулярно-генетические свойства штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор, циркулирующих на Африканском континенте. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2017; 35(1): 12–9. <https://doi.org/10.18821/0208-0613-2017-35-1-12-1>
- Buroni S., Pollini S., Rossolini G.M., Perrin E. Editorial: evolution of genetic mechanisms of antibiotic resistance. *Front. Genet.* 2019; 10: 983. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00983>
- Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data; 2010. Available at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014; 30(15): 2114–20. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 2013; 29(8): 1072–5. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- Bertels F., Silander O.K., Pachkov M., Rainey P.B., van Nimwegen E. Automated reconstruction of whole-genome phylogenies from short-sequence reads. *Mol. Biol. Evol.* 2014; 31(5): 1077–88. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu088>
- Dash H.R., Shrivastava P., Mohapatra B.K., Das S., eds. *DNA Fingerprinting: Advancements and Future Endeavors*. Singapore: Springer; 2018. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-1583-1>
- Савельева И.В., Куличенко А.Н., Савельев В.Н., Ковалев Д.А., Васильева О.В., Жиров А.М. и др. MLVA-типиро-

- вание клинических штаммов генетически измененных *Vibrio cholerae* biotype El tor, изолированных в России и Украине в период седьмой пандемии холеры. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2018; 95(6): 37–43. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-6-37-43>
25. Смирнова Н.И., Кульшань Т.А., Краснов Я.М. MLVA-типирование клинических штаммов *Vibrio cholerae*, изолированных в разные периоды текущей пандемии холеры. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2015; 33(1): 15–22.
26. Nguyen D.T., Ngo T.C., Le T.H., Nguyen H.T., Morita M., Arakawa E., et al. Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* O1 in Northern Vietnam (2007–2009), using multilocus variable-number tandem repeat analysis. *J. Med. Microbiol.* 2016; 65(9): 1007–12. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000317>
27. Bwire G., Sack D.A., Almeida M., Li S., Voeglein J.B., Debes A.K., et al. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* responsible for cholera epidemics in Uganda by PCR, MLVA and WGS. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018; 12(6): e0006492. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006492>
28. Mironova L.V., Gladkikh A.S., Ponomareva A.S., Feranchuk S.I., Bochalgin N.O., Basov E.A., et al. Comparative genomics of *Vibrio cholerae* El Tor strains isolated at epidemic complications in Siberia and at the Far East. *Infect. Genet. Evol.* 2018; 60: 80–8. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.02.023>
29. Hossain Z.Z., Leekitcharoenphon P., Dalsgaard A., Sultana R., Begum A., Jensen P.K.M., et al. Comparative genomics of *Vibrio cholerae* O1 isolated from cholera patients in Bangladesh. *Lett. Appl. Microbiol.* 2018; 67(4): 329–36. <https://doi.org/10.1111/lam.13046>
- REFERENCES
1. WHO. International Health Regulations (2005). Available at: https://www.who.int/ihr/IHR_2005_en.pdf
2. Ramamurthy T., Mutreja A., Weill F.X., Das B., Ghosh A., Nair G.B. Revisiting the global epidemiology of cholera in conjunction with the genomics of *Vibrio cholerae*. *Front. Public Health*. 2019; 7: 203. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00203>
3. Greig D.R., Schaefer U., Octavia S., Hunter E., Chattaway M.A., Dallman T.J., et al. Evaluation of whole-genome sequencing for identification and typing of *Vibrio cholerae*. *J. Clin. Microbiol.* 2018; 56(11): e00831–18. <https://doi.org/10.1128/JCM.00831-18>
4. Moskvitina E.A., Tyuleneva E.G., Kruglikov V.D., Titova S.V., Vodop'yanov A.S., Kurilenko M.L., et al. Cholera: assessment of epidemiological situation on cholera around the world and in Russia in 2008–2017. Forecast for 2018. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2018; (1): 36–43. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2018-1-36-43> (in Russian)
5. Kharchenko G.A., Kimirilova O.G., Burkin V.S. Epidemiology and clinic of Cholera 1970 in the Astrakhan region. *Detskie infektsii*. 2019; 18(1): 51–5. <https://doi.org/10.22627/2072-8107-2019-18-1-51-55> (in Russian)
6. Onishchenko G.G., Moskvitina E.A., Vodop'yanov A.S., Monakhova E.V., Pisanov R.V., Vodop'yanov S.O., et al. Retrospective molecular-epidemiological analysis of cholera epidemic in the Republic of Dagestan in 1994. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2016; (4): 33–41. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-4-33-41> (in Russian)
7. Cheldyshova N.B., Kritskiy A.A., Lozovskiy Yu.V., Guseva N.P. Comparative MLVA-analysis of *Vibrio cholerae* strains of classical biovar, isolated in the Russian Federation and abroad. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2016; (4): 88–92. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-4-88-92> (in Russian)
8. George C.M., Rashid M., Almeida M., Saif-Ur-Rahman K.M., Monira S., Bhuyian M.S.I., et al. Genetic relatedness of *Vibrio cholerae* isolates within and between households during outbreak breaks in Dhaka, Bangladesh. *BMC Genomics*. 2017; 18(1): 903. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4254-9>
9. Kachwamba Y., Mohammed A.A., Lukupulo H., Urio L., Majigo M., Mosha F., et al. Genetic characterization of *Vibrio cholerae* O1 isolates from outbreaks between 2011 and 2015 in Tanzania. *BMC Infect. Dis.* 2017; 17(1): 157. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2252-9>
10. Garrine M., Mandomando I., Vubil D., et al. Minimal genetic change in *Vibrio cholerae* in Mozambique over time: Multilocus variable number tandem repeat analysis and whole genome sequencing. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2017; 11(6): e0005671. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005671>
11. Vodop'yanov A.S., Vodop'yanov S.O., Oleynikov I.P., Mishan'kin B.N. INDEL-genotyping of *Vibrio cholerae* strains. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 2017; 22(4): 195–200. <https://doi.org/10.18821/1560-9529-2017-22-4-195-200> (in Russian)
12. Vodop'yanov A.S., Mazrukho A.B., Vodop'yanov S.O., Mishan'kin B.N., Kruglikov V.D., Arkhangel'skaya I.V., et al. VNTR-genotyping of *Vibrio cholerae* strains isolated from objects in the territory of Russian Federation in 2012. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2014; 91(2): 46–51. (in Russian)
13. Selyanskaya N.A., Arkhangel'skaya I.V., Vodop'yanov A.S., Vodop'yanov S.O., Kruglikov V.D., Vodyanitskaya S.Yu., et al. Typing of *Vibrio cholerae* non O1/non O139 strains, isolated in Rostov region in 2014. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2016; 93(1): 3–9. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2016-1-3-9> (in Russian)
14. Vodop'yanov A.S., Vodop'yanov S.O., Oleynikov I.P., Mishan'kin B.N., Kruglikov V.D., Arkhangel'skaya I.V., et al. INDEL- and VNTR-typing *Vibrio cholerae* strains, isolated in 2013 from the environment objects in the Russian Federation. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya*. 2015; (5): 41–4. (in Russian)
15. Van Boeckel T.P., Brower C., Gilbert M., Grenfell B.T., Levin S.A., Robinson T.P., et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015; 112(18): 5649–54. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
16. Sizova Yu.V., Pisanov R.V., Vodop'yanov A.S., Cherepakhina I.Ya., Burlakova O.S. Phenotypic and genotypic analysis of toxin production of typical and atypical stamps of *Vibrio cholerae* in stress environmental conditions. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya*. 2017; (3): 141. (in Russian)
17. Cheldyshova N.B., Smirnova N.I., Zadnova S.P., Krasnov Ya.M., Kritskiy A.A., Buaro M.I., et al. Molecular-genetic properties of *Vibrio cholerae* El tor strains circulating in Africa. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2017; 35(1): 12–9. <https://doi.org/10.18821/0208-0613-2017-35-1-12-1>
18. Buroni S., Pollini S., Rossolini G.M., Perrin E. Editorial: evolution of genetic mechanisms of antibiotic resistance. *Front. Genet.* 2019; 10: 983. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00983>
19. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data; 2010. Available at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
20. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014; 30(15): 2114–20. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
21. Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 2013; 29(8): 1072–5. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
22. Bertels F., Silander O.K., Pachkov M., Rainey P.B., van Nimwegen E. Automated reconstruction of whole-genome phylogenies from short-sequence reads. *Mol. Biol. Evol.* 2014; 31(5): 1077–88. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu088>
23. Dash H.R., Shrivastava P., Mohapatra B.K., Das S., eds. *DNA Fingerprinting: Advancements and Future Endeavors*. Singapore: Springer; 2018. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-1583-1>

24. Savel'eva I.V., Kulichenko A.N., Savel'ev V.N., Kovalev D.A., Vasil'eva O.V., Zhirov A.M., et al. MLVA-typing of clinical stamps of genetically changed *Vibrio cholerae* biotype El tor insulated in Russia and Ukraine in the period of seventh pandemic cholera. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2018; 95(6): 37–43. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-6-37-43> (in Russian)
25. Smirnova N.I., Kul'shan' T.A., Krasnov Ya.M. MLVA typing of clinical *Vibrio cholerae* strains isolated during different periods of the current cholera pandemic. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2015; 33(1): 15–22. (in Russian)
26. Nguyen D.T., Ngo T.C., Le T.H., Nguyen H.T., Morita M., Arakawa E., et al. Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* O1 in Northern Vietnam (2007–2009), using multilocus variable-number tandem repeat analysis. *J. Med. Microbiol.* 2016; 65(9): 1007–12. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000317>
27. Bwire G., Sack D.A., Almeida M., Li S., Voeglein J.B., Debes A.K., et al. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* responsible for cholera epidemics in Uganda by PCR, MLVA and WGS. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018; 12(6): e0006492. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006492>
28. Mironova L.V., Gladkikh A.S., Ponomareva A.S., Feranchuk S.I., Bochalgin N.O., Basov E.A., et al. Comparative genomics of *Vibrio cholerae* El Tor strains isolated at epidemic complications in Siberia and at the Far East. *Infect. Genet. Evol.* 2018; 60: 80–8. <https://doi.org/10.1016/j.mecgid.2018.02.023>
29. Hossain Z.Z., Leekitcharoenphon P., Dalsgaard A., Sultana R., Begum A., Jensen P.K.M., et al. Comparative genomics of *Vibrio cholerae* O1 isolated from cholera patients in Bangladesh. *Let. Appl. Microbiol.* 2018; 67(4): 329–36. <https://doi.org/10.1111/lam.13046>

Информация об авторах

Ковалев Дмитрий Анатольевич[✉] — к.х.н., зав. лаб. биохимии Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, stavnipchi@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9366-5647>

Шапаков Николай Андреевич — м.н.с. лаб. биохимии Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9152-4026>

Писаренко Сергей Владимирович — к.х.н., в.н.с. лаб. биохимии Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6458-6790>

Савельева Ирина Вилорьевна — к.м.н., врач-бактериолог научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1254-2259>

Васильева Оксана Васильевна — к.м.н., зав. лаб. диагностики бактериальных инфекций Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <http://orcid.org/0000-0002-8882-6477>

Савельев Вилорий Николаевич — д.м.н., г.н.с. лаб. эпидемиологии Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6458-3725>

Сирица Юлия Владимировна — биолог лаб. диагностики бактериальных инфекций Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9442-6966>

Жиров Андрей Михайлович — м.н.с. лаб. биохимии Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <http://orcid.org/0000-0002-7698-7361>

Ульшина Диана Васильевна — н.с. лаб. биохимии Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7754-2201>

Кузнецова Ирина Владимировна — врач-бактериолог лаб. биохимии Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <http://orcid.org/0000-0001-9513-0761>

Бобрышева Ольга Викторовна — м.н.с. лаб. биохимии Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6338-4476>

Куличенко Александр Николаевич — д.м.н., проф., член-корр. РАН, директор Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9362-3949>

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

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

Статья поступила в редакцию 28.05.2020; принята к публикации 28.10.2020; опубликована 25.02.2021.

Information about the authors

Dmitry A. Kovalev[✉] — PhD (Chem.), Head, Laboratory of biochemistry, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, stavnipchi@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9366-5647>

Nikolay A. Shapakov — junior researcher, Laboratory of biochemistry, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9152-4026>

Sergey V. Pisarenko — PhD (Chem.), leading researcher, Laboratory of biochemistry, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6458-6790>

Irina V. Savel'eva — PhD (Med.), doctor-bacteriologist, Research and production laboratory of drugs for the diagnosis of especially dangerous and other infections, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1254-2259>

Oksana V. Vasil'eva — PhD (Med.), Head, Laboratory of diagnosis of bacterial infections, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <http://orcid.org/0000-0002-8882-6477>

Vilory N. Savel'ev — D. Sci. (Med.), main researcher, Laboratory of epidemiology, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6458-3725>

Yulia V. Siritsa — biologist, Laboratory of diagnosis of bacterial infections, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9442-6966>

Andrey M. Zhirov — junior researcher, Laboratory of biochemistry, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <http://orcid.org/0000-0002-7698-7361>

Diana V. Ul'shina — researcher, Laboratory of biochemistry, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7754-2201>

Irina V. Kuznetsova — doctor-bacteriologist, Laboratory of biochemistry, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <http://orcid.org/0000-0001-9513-0761>

Olga V. Bobrysheva — junior researcher, Laboratory of biochemistry, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6338-4476>

Aleksandr N. Kulichenko — D. Sci. (Med.), Prof., Associate Member of RAS, Director, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9362-3949>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

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

The article was submitted 28.05.2020; accepted for publication 28.10.2020; published 25.02.2021.



Влияние антибиотиков на образование биоплёнки *Streptococcus pyogenes* в условиях *in vitro*

Аджиева А.А.[✉], Данилова Т.А., Данилина Г.А., Шевлягина Н.В., Минко А.Г., Жуховицкий В.Г.

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

Цель настоящей работы — изучение влияния антибиотиков оксациллина и цефазолина на рост культуры и образование биоплёнки штамма *Streptococcus pyogenes* 30M в условиях *in vitro*.

Материалы и методы. Формирование биоплёнок исследовали в световом и сканирующем электронном микроскопе, на стерильных покровных стёклах с использованием специальных питательных сред. Для выявления опытные образцы окрашивали водно-спиртовым раствором альцианового синего.

Результаты. Небольшие количественные дозы (0,01–0,1 мг) оксациллина и цефазолина, независимо от длительности их воздействия, не оказывали негативного влияния как на процесс формирования, так и на готовую стрептококковую биоплёнку. Увеличение количественных доз антибиотиков до 0,5 и 1,0 мг на стадии формирования биоплёнки стрептококка оказывало ингибирующее действие на рост микробных клеток и образование биоплёнки. При действии оксациллина и цефазолина в дозах 0,5 и 1,0 мг на сформированную биоплёнку сохранялась целостность стрептококковых цепочек и биоплёнки. При этом наблюдался эффект скручивания микробных цепочек в шарообразные формы с окрашенной биоплёнкой внутри. Кроме того, отмечалось стимулирующее воздействие цефазолина на готовую стрептококковую биоплёнку. При воздействии на сформированную биоплёнку высоких доз антибиотиков (2 мг и выше) наблюдался разрыв стрептококковых цепочек, при этом оксациллин оказывал разрушающее действие и на микробную биоплёнку. В аналогичных опытах с цефазолином биоплёнка сохранялась, несмотря на то что наблюдался также разрыв микробных цепочек.

Заключение. Выявлены значительные различия в действии испытанных антибиотиков как на зрелую биоплёнку штамма *S. pyogenes* 30M, так и на процесс её формирования.

Ключевые слова: биоплёнка, матрикс, оксациллин, цефазолин, микроскопия, *S. pyogenes*

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Для цитирования: Аджиева А.А., Данилова Т.А., Данилина Г.А., Шевлягина Н.В., Минко А.Г., Жуховицкий В.Г. Влияние антибиотиков на образование биопленки *Streptococcus pyogenes* в условиях *in vitro*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2021; 98(1):59–64.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-64>

Influence of antibiotics on biofilm formation by *Streptococcus pyogenes* *in vitro*

Atikat A. Adzhieva[✉], Tatyana A. Danilova, Galina A. Danilina, Natalya V. Shevlyagina, Aleksey G. Minko, Vladimir G. Zhukhovitsky

N.F. Gamaleya Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Aim. To study the effect of the antibiotics oxacillin and cefazolin on culture growth and biofilm formation of *Streptococcus pyogenes* type 30M *in vitro*.

Materials and methods. The formation of biofilms was studied in light and scanning electron microscope, on sterile cover glasses using special nutrient medium. To identify the biofilm, experimental samples were stained with alcohol-water solution of alcian blue.

Results. Small quantitative doses (0.01–0.1 mg) of oxacillin and cefazoline, regardless of the duration of the exposure, did not have a negative effect both on the biofilm formation process and the formed streptococcal biofilm. An increase in quantitative doses of antibiotics to 0.5–1.0 mg at the stage of formation of *Streptococcus*

biofilm had an inhibitory effect on the growth of microbial cells and the formation of biofilm. The integrity of streptococcal chains and biofilm was preserved when oxacillin and cefazoline were applied at a quantity of 0.5–1.0 mg to the formed biofilm. However, in some cases, the twisting of the chains in spherical shape with visible colored biofilm inside was observed. In addition, there was a stimulating effect of cefazoline on the formed *Streptococcal* biofilm. When the formed biofilm was exposed to high doses of antibiotics (2 mg or higher), a break of streptococcal chains was observed, while oxacillin had a destructive effect on the microbial biofilm. In similar experiments with cefazolin, the biofilm was preserved, despite the fact that the destruction of microbial chains was also observed.

Conclusion. Significant differences were found in the effect of tested antibiotics on both the mature *S. pyogenes* type 30M biofilm and the biofilm formation process.

Keywords: *biofilm, matrix, oxacillin, cefazolin, microscopy, Streptococcus pyogenes*

For citation: Adzhieva A.A., Danilova T.A., Danilina G.A., Shevlyagina N.V., Minko A.G., Zhukhovitsky V.G. Influence of antibiotics on biofilm formation by *Streptococcus pyogenes* *in vitro*. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(1):59–64. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-64>

Введение

Проблема резистентности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (АБП) остаётся актуальной. Известно, что быстрому распространению генов множественной резистентности способствуют мигрирующие элементы, в частности плазмиды, фаги, включающие данные гены в свой состав и передающие их другим бактериям.

Другим важным фактором, ответственным за повышенную устойчивость бактерий к АБП, являются биоплёнки — способ защиты, позволяющий бактериям выживать и размножаться в условиях макроорганизма [1]. Важным свойством биоплёнок является их способность к адгезии на различных биотических и абиотических поверхностных субстратах [2]. Структура биоплёнки — это непрерывный мультислой бактериальных клеток, заключённых в биополимерный матрикс. В состав матрикса входят белки, нуклеиновые кислоты, липиды, но его главный компонент — экзогенные полисахариды [3, 4]. Матрикс защищает биоплёнку от повреждающих воздействий, в том числе факторов врождённого и приобретённого иммунитета, АБП. В результате биоплёнки значительно менее чувствительны к АБП, чем те же бактерии в планктонной форме, а способность бактерий к формированию биоплёнок является одной из причин хронизации инфекции [5, 6].

Бактерии рода *Streptococcus* обладают наибольшей чувствительностью к АБП пенициллиновой группы и в то же время наименее чувствительны или умеренно чувствительны к цефалоспорином 1–2-го поколения [7]. В связи с этим представляло определённый интерес изучить влияние на рост культуры и биоплёнокообразование *Streptococcus pyogenes* оксациллина и цефазолина — представителей вышеуказанных групп АБП.

Цель исследования — изучение влияния оксациллина и цефазолина на рост культуры и формирование биоплёнки штамма *S. pyogenes* 30M (Пражская коллекция) в условиях *in vitro*.

Материалы и методы

Рост культуры и процесс формирования биоплёнок исследовали с помощью световой и электронной микроскопии на стерильных покровных стёклах с использованием специальных питательных сред. Покровные стёкла предварительно тщательно промывали, сначала в щелочном растворе детергента, затем в проточной воде, и выдерживали в смеси Никифорова для обезжиривания; стерилизовали в сухо-жаровом шкафу при 180°C в течение 1,5–2,0 ч. Суточную культуру штамма *S. pyogenes* 30M пересеивали на бульон Todd Hewitt Broth (ТНВ) с 0,5% экстракта дрожжей и культивировали при 37°C в течение 24 ч. Полученную суспензию штамма *S. pyogenes* 30M доводили до концентрации микробных клеток, соответствующей 1,0 по шкале мутности McFarland с помощью бульона ТНВ с 0,5% экстракта дрожжей; 100 мкл этой суспензии, содержащей $5,0 \times 10^7$ КОЕ/мл штамма *S. pyogenes* 30M, наносили на стерильное покровное стекло размером 24 × 24 мм. Покровные стёкла с суспензиями в стерильных чашках Петри (55 мм) помещали в полиэтиленовые пакеты с полосками смоченной фильтровальной бумаги для создания влажной камеры.

В работе использовали следующие количества оксациллина и цефазолина («Синтез»): 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,0 и 4,0 мг. Готовили водный раствор АБП с концентрацией 200 мг/мл, который разводили таким образом, чтобы в 10–20 мкл раствора АБП содержалась необходимая опытная доза препарата. Затем препарат добавляли к 80–90 мкл суспензии с $5,0 \times 10^7$ КОЕ/мл штамма *S. pyogenes* 30M, нанесённой на стерильное покровное стекло. В контрольных опытах без воздействия АБП на покровное стекло помещали 100 мкл микробной суспензии, содержащей ту же концентрацию микробных клеток исследуемого штамма.

Исследования проводили в двух вариантах: в первом изучали влияние определённых доз АБП на рост культуры и формирование биоплёнки стреп-

тококка, во втором — влияние тех же доз АБП на готовую сформированную биоплёнку того же микроорганизма. В первом варианте на покровное стекло наносили одновременно микробную суспензию (80–90 мкл) и водный раствор с определённой дозой АБП (в объёме 10–20 мкл). Инкубировали 48 ч при 37°C по вышеописанной методике. Во втором варианте на покровное стекло наносили 80–90 мкл микробной суспензии, содержащей $5,0 \times 10^7$ КОЕ/мл исследуемого штамма микроорганизма. Через 48 ч инкубации при 37°C по вышеописанной методике на это же стекло наносили водный раствор с необходимой количественной дозой АБП (в объёме 10–20 мкл) и продолжали процесс инкубации в тех же условиях. Длительность действия оксациллина и цефазолина составляла 2, 4 и 24 ч. По окончании инкубации покровные стекла с биоплёнкой промывали дистиллированной водой, фиксировали над пламенем и окрашивали в течение 2–3 мин 1% спиртовым раствором альцианового синего («Био-Витрум»), предварительно разведённым дистиллированной водой в соотношении 1: 9 [8].

Препараты просматривали в световом микроскопе «Axiostar plus» («Zeiss») при общем увеличении $\times 400$. Для сканирующей электронной микроскопии препараты фиксировали формалином в течение 24 ч. Фиксированные образцы биоплёнок *S. pyogenes* крепили на алюминиевые столики и напыляли золотом (толщина слоя 5 нм) в модуле для напыления «SPI-Module Sputter Coater» («SPI Supplements»). Для анализа образцов использовали двулучевой ионно-электронный сканирующий микроскоп «Quanta

200 3D» («FEI Company») в режиме высокого вакуума при ускоряющем напряжении 5–10 кВ.

Результаты

Результаты исследований показали, что в нормальных условиях выращивания, без воздействия АБП, клетки *S. pyogenes* образуют биоплёнку голубоватого цвета, состоящую из полисахаридного матрикса, окружающего стрептококковые цепочки (рис. 1, а).

При исследовании в сканирующем электронном микроскопе выявлена многослойная структура биоплёнки, которая была неравномерной и варьировала от одной до нескольких клеток. Экзомакс более четко виден на участках скопления микроорганизмов (рис. 1, б).

В опытах по изучению воздействия оксациллина и цефазолина на рост культуры и процесс формирования биоплёнки показано, что небольшие дозы антибиотика (0,01, 0,05 и 0,1 мг) не оказывали негативного воздействия как на целостность стрептококковых цепочек, так и на микробную биоплёнку независимо от длительности его воздействия — 2, 4 и 24 ч (рис. 1, а). В то же время при действии АБП в дозах 0,5 и 1,0 мг наблюдалось подавление роста микробных клеток. При световом микроскопировании можно было видеть отдельные кокки и обрывки стрептококковых цепочек по всему полю зрения. Эффект действия АБП в данном количественном диапазоне на стадии роста и формирования биоплёнки стрептококка наблюдался уже после 4-часовой экспозиции. Дальнейшее повышение дозы АБП

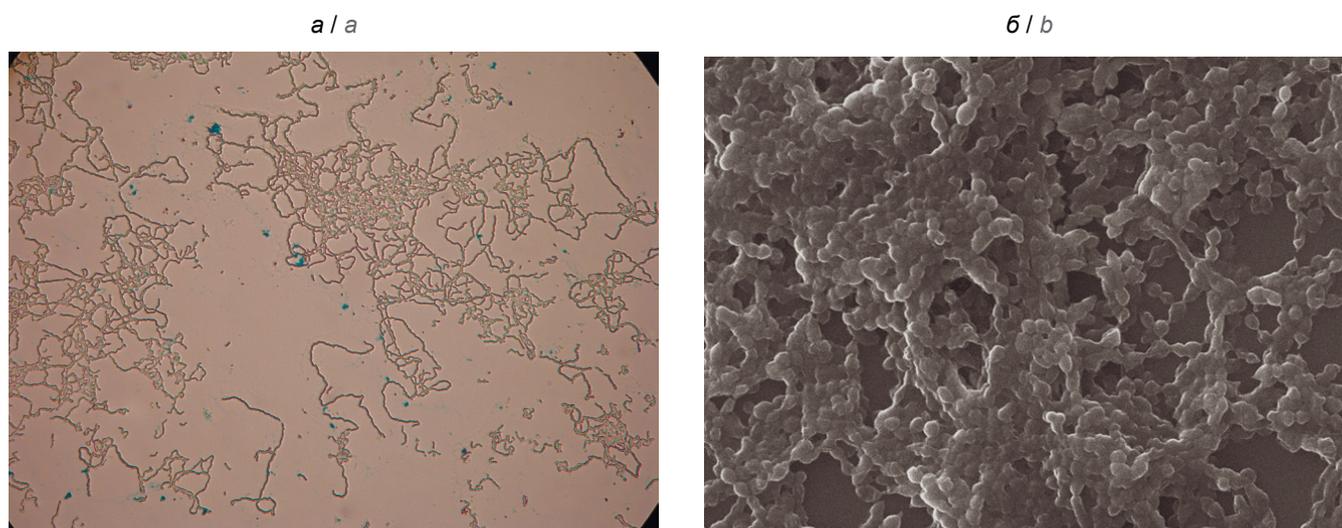


Рис. 1. Микрофотография цепочек и биопленок *S. pyogenes* тип 30М, выращенных на среде ТНВ с 0,5% экстракта дрожжей.

а — световая микроскопия, цепочки кокков, окруженные биопленкой; окраска альциановым синим, $\times 400$;
б — сканирующая электронная микроскопия, многослойная структура клеток, плотно прилегающих друг к другу и частично объединенных экзомаксом.

Fig. 1. Chains and biofilms of *S. pyogenes* type 30M grown on Toood Hewitt Broth medium with 0.5% yeast extract.

а — light microscopy, cocci chains surrounded by biofilm; stained with Alcian Blue, $\times 400$; б — scanning electron microscopy, the multilayer structure of bacterial cells that are tightly adjacent to each other, partially united by an exopolysaccharide.

(до 2 мг и более) и времени их воздействия (4 ч и дольше) на стадии формирования биоплёнки стрептококка приводило к полному подавлению микробного роста и, как следствие, отсутствию биоплёнки.

В опытах по изучению воздействия оксациллина и цефазолина на сформированную биоплёнку установлено, что малые дозы АБП (0,01, 0,05 и 0,1 мг), независимо от времени их воздействия, не нарушали целостность стрептококковых цепочек и готовой биоплёнки. В аналогичных опытах в диапазоне воздействия более высоких доз (0,5 и 1,0 мг) оба АБП также не нарушали целостность стрептококковых цепочек. Однако при этом стабильно наблюдался эффект скручивания последних в шарообразные формы, внутри которых хорошо просматривалась окрашенная биоплёнка (рис. 2). В этом диапазоне концентраций отмечено стимулирующее влияние це-

фазолина на сформированную биоплёнку. При световой и электронной микроскопии опытных образцов с цефазолином можно наблюдать увеличение слоя биополимерного полисахаридного матрикса зрелой биоплёнки, окружающего стрептококковые цепочки. В интервале воздействия самых высоких доз АБП (2 и 4 мг) на готовую биоплёнку наблюдался разрыв микробных цепочек на отдельные фрагменты. При этом под воздействием оксациллина отмечался не только разрыв стрептококковых цепочек, но и разрушение биоплёнки (рис. 3, а). В аналогичных опытах с цефазолином, несмотря на разрыв микробных цепочек, биоплёнка сохранялась (рис. 3, б).

Обсуждение

Применение покровных стёкол в качестве абиотической поверхности даёт возможность наблюдать

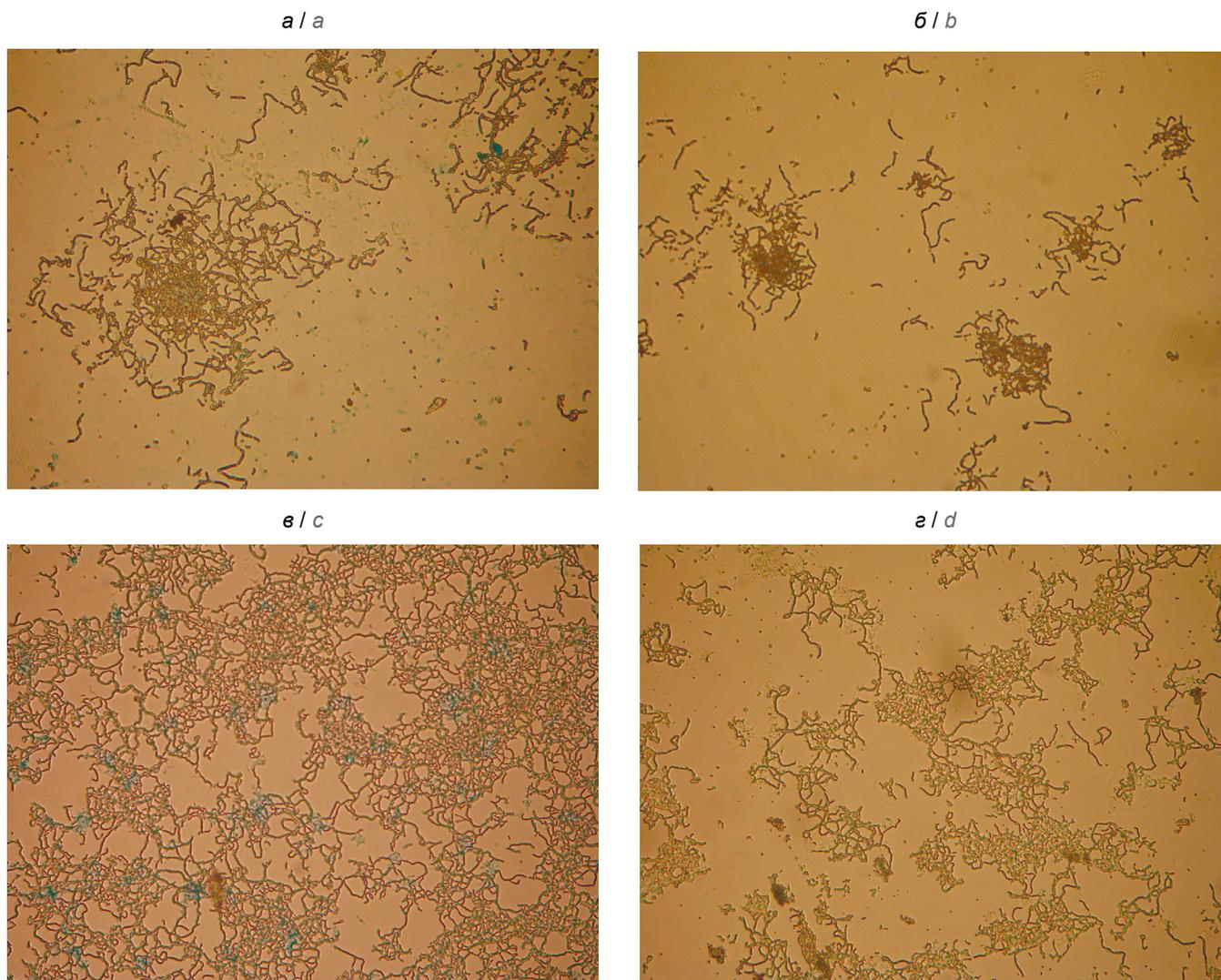


Рис. 2. Микрофотография цепочек и готовой сформированной биоплёнки *S. pyogenes* 30M под воздействием низких доз АБП.

а — оксациллин, 0,5 мг; б — оксациллин, 1,0 мг; в — цефазолин, 0,5 мг; г — цефазолин, 1,0 мг. Окраска альциановым синим, × 400.

Fig. 2. Chains and biofilm of *S. pyogenes* type 30M under the influence of the low doses of antibiotics.

а — oxacillin, 0.5 mg; б — oxacillin, 1.0 mg; в — cefazolin, 0.5 mg; г — cefazolin, 1.0 mg. Stained with Alcian Blue, × 400.

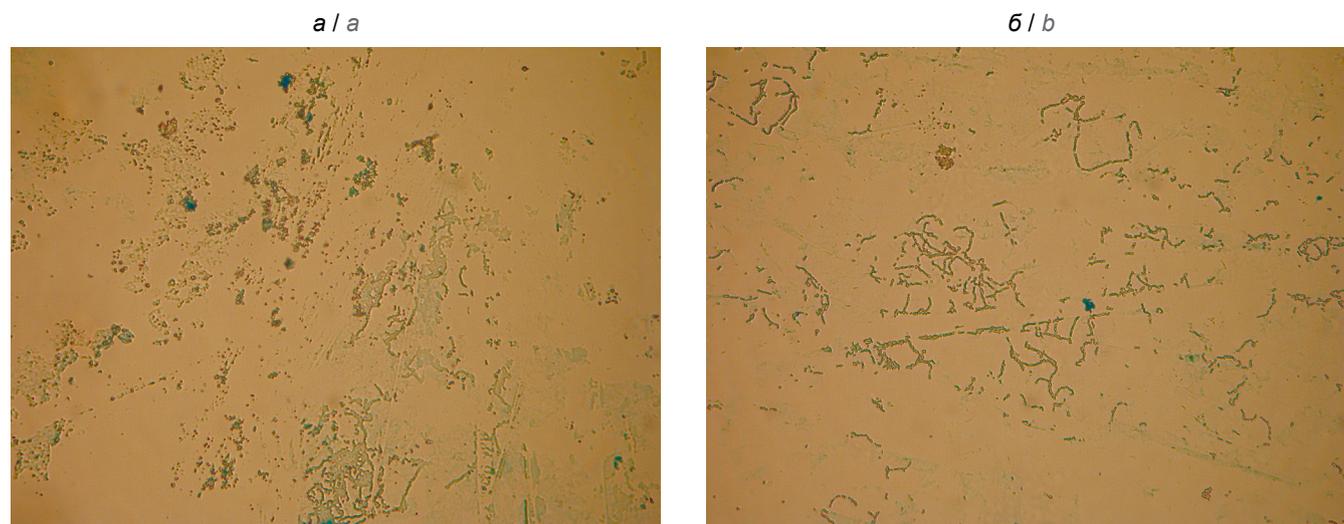


Рис. 3. Микрофотография цепочек и сформированной биоплёнки *S. pyogenes* 30М под воздействием высоких доз АБП.
а — оксациллин, 2,0 мг; б — цефазолин, 4,0 мг. Окраска альциановым синим, × 400.

Fig. 3. Chains and biofilm of *S. pyogenes* type 30M under the influence of high doses of antibiotics.
a — oxacillin, 2.0 mg; b — cefazolin, 4.0 mg. Stained with Alcian Blue, × 400.

за процессом формирования биоплёнки в нормальных условиях и при воздействии различных препаратов, в том числе АБП, в отличие от методов, используемых нами в предыдущих исследованиях [9–11].

Исследование влияния оксациллина и цефазолина на процесс формирования и готовую биоплёнку показало, что оба АБП в дозах 0,5 и 1,0 мг, начиная с 4-часового воздействия, на стадии формирования биоплёнки стрептококка оказывают одинаковое ингибирующее действие на рост микробных клеток и образование биоплёнки. В то же время низкие дозы АБП, независимо от длительности их воздействия, не оказывали негативного влияния как на процесс формирования, так и на зрелую сформированную биоплёнку.

При увеличении доз оксациллина и цефазолина, воздействующих на готовую сформированную биоплёнку, до 0,5 и 1,0 мг сохранялась целостность биоплёнки и стрептококковых цепочек. Однако при этом наблюдался эффект скручивания последних в шарообразные формы с хорошо просматриваемой окрашенной биоплёнкой внутри. Следует отметить, что так называемый эффект скручивания стрептококковых цепочек в этом диапазоне концентраций в большей степени проявлялся под воздействием оксациллина. Цефазолин оказывает более «мягкое» воздействие на структуру стрептококковых цепочек в сравнении с оксациллином. Кроме того, в данном количественном диапазоне АБП отмечалось стимулирующее влияние цефазолина на зрелую сформированную стрептококковую биоплёнку. Данное обстоятельство, по-видимому, связано с действием цефазолина на продукцию полисахаридного компонента в составе биополимерного матрикса биоплёнки стрептококка. Следует отметить, что длительность

воздействия цефазолина в этом количественном диапазоне на целостность стрептококковых цепочек и микробной биоплёнки существенно не влияла.

При воздействии на сформированную биоплёнку наиболее высоких доз АБП наблюдался разрыв стрептококковых цепочек, при этом оксациллин оказывал разрушающее действие и на микробную биоплёнку. В аналогичных опытах с цефазолином биоплёнка сохранялась, несмотря на то что разрыв стрептококковых цепочек тоже наблюдался.

Выявленные значительные различия в действии испытанных АБП как на зрелую биоплёнку штамма *S. pyogenes* 30М, так и на процесс её формирования в определённой степени коррелируют как с высокой чувствительностью стрептококков к АБП пенициллинового ряда, так и с определённой устойчивостью данного микроорганизма к цефалоспорином 1–2-го поколения [7].

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Николаев Ю.А., Плакунов В.К. Биоплёнка — «город микробов» или аналог многоклеточного организма? *Микробиология*. 2007; 76(2): 149–63.
2. Kolari M. *Attachment mechanisms and properties of bacterial biofilms on non-living surfaces*: Diss. Helsinki; 2003.
3. Смирнова Т.А., Диденко Л.В., Азизбекян Р.Р., Романова Ю.М. Структурно-функциональная характеристика бактериальных биоплёнок. *Микробиология*. 2010; 79(4): 435–46.
4. Donlan R.M. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 2002; 8(9): 881–90. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>
5. Гинцбург А.Л., Ильина Т.С., Романова Ю.М. «Quorum sensing» или социальное поведение бактерий. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2003; (5): 86–93.
6. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilm: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999; 284(5418): 1318–22. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>

7. Шепелин И.А., Миронов А.Ю., Шепелин К.А. *Антибиотики. Справочник бактериолога*. М.; 2018.
8. Герхард Ф., ред. *Методы общей бактериологии. Том 1*. Пер. с англ. М.: Мир; 1983.
9. Данилова Т.А., Данилина Г.А., Аджиева А.А., Минко А.Г., Алексеева Н.А. Формирование биоплёнок стрептококками группы А разных типов и изучение влияния антибиотиков на этот процесс. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2015; (2): 50–4.
10. Данилова Т.А., Данилина Г.А., Аджиева А.А., Минко А.Г., Николаева Т.Н., Жуховицкий В.Г. и др. Влияние мирамистина и фоспренила на микробные биоплёнки. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2017; 163(4): 435–8. <https://doi.org/10.1007/s10517-017-3823-x>
11. Данилова Т.А., Смирнова Т.А., Данилина Г.А., Аджиева А.А., Андреевская С.Г., Шевлягина Н.В. и др. Морфологическое и ультраструктурное исследование особенностей биоплёнок, формируемых *Streptococcus pyogenes*, методами световой и электронной микроскопии. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2018; 165(1): 127–32. <https://doi.org/10.1007/S10517-018-4110-1>
4. Donlan R.M. Biofilms: Microbiol life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 2002; 8(9): 881–90. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>
5. Gintsburg A.L., Il'ina T.S., Romanova Yu.M. «Quorum sensing» or social behavior of bacteria. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2003; (5): 86–93. (in Russian)
6. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilm: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999; 284(5418): 1318–22. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
7. Shepelin I.A., Mironov A.Yu., Shepelin K.A. Antibiotics. Reference book of the bacteriologist [*Antibiotiki. Spravochnik bakteriologa*]. Moscow; 2018. (in Russian)
8. Gerhard P., ed. *Manual Methods for General Bacteriology*. Washington: ASM; 1981. (in Russian)
9. Danilova T.A., Danilina G.A., Adzhieva A.A., Minko A.G., Alekseeva N.A. Biofilm formation by group A streptococci of various types and study of antibiotics effect on this process. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2015; (2): 50–4. (in Russian)
10. Danilova T.A., Danilina G.A., Adzhieva A.A., Minko A.G., Nikolaeva T.N., Zhukhovitskiy V.G., et al. Effects of Miramistin and Phosprenil on microbial biofilms. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2017; 163(4): 439–42. <https://doi.org/10.1007/s10517-017-3823-x>
11. Danilova T.A., Smirnova T.A., Danilina G.A., Adzhieva A.A., Andreevskaya S.G., Shevlyagina N.V., et al. Optical and electron microscopic study of the morphology and ultrastructure of biofilms formed by *Streptococcus pyogenes*. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2018; 165(1): 110–4. <https://doi.org/10.1007/s10517-018-4110-1>

REFERENCES

1. Nikolaev Yu.A., Plakunov V.K. Biofilm — «microbes city» or analog of multicellulars organism? *Mikrobiologiya*. 2007; 76(2): 149–63. (in Russian)
2. Kolari M. *Attachment mechanisms and properties of bacterial biofilms on non-living surfaces*: Diss. Helsinki; 2003.
3. Smirnova T.A., Didenko L.V., Azizbekyan R.R., Romanova Yu.M. Structural and functional characteristics of bacterial biofilms. *Mikrobiologiya*. 2010; 79(4): 435–46. (in Russian)

Информация об авторах

Аджиева Атикат Абдулазимовна[✉] — к.б.н., с.н.с. лаб. индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, atikatnp@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9400-9633>

Данилова Татьяна Абрамовна — д.б.н., г.н.с. лаб. индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8451-2553>

Данилина Галина Алексеевна — к.м.н., с.н.с. лаб. индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9615-6082>

Шевлягина Наталья Владимировна — к.м.н., с.н.с. лаб. индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9651-1654>

Минко Алексей Георгиевич — м.н.с. лаб. индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2850-0539>

Жуховицкий Владимир Григорьевич — к.м.н., рук. лаб. индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4653-2446>

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

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

Статья поступила в редакцию 10.07.2020; принята к публикации 22.01.2021; опубликована 25.02.2021.

Information about the authors

Atikat A. Adzhieva[✉] — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Laboratory of detection and ultrastructural analysis of microorganisms, N.F. Gamaleya National Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, atikatnp@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9400-9633>

Tatyana A. Danilova — D. Sci. (Biol.), main researcher, Laboratory of detection and ultrastructural analysis of microorganisms, N.F. Gamaleya National Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8451-2553>

Galina A. Danilina — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of detection and ultrastructural analysis of microorganisms, N.F. Gamaleya National Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9615-6082>

Natalya V. Shevlyagina — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of detection and ultrastructural analysis of microorganisms, N.F. Gamaleya National Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9651-1654>

Aleksey G. Minko — junior researcher, Laboratory of detection and ultrastructural analysis of microorganisms, N.F. Gamaleya National Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2850-0539>

Vladimir G. Zhukhovitskiy — Cand. Sci. (Med.), Head, Laboratory of detection and ultrastructural analysis of microorganisms, N.F. Gamaleya National Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4653-2446>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

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

The article was submitted 10.07.2020; accepted for publication 22.01.2021; published 25.02.2021.

ОБЗОРЫ

Научный обзор
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-62>



Нарушения кишечной микробиоты при расстройствах аутистического спектра: новые горизонты в поиске патогенетических подходов к терапии. Часть 1. Особенности кишечной микробиоты при расстройствах аутистического спектра

Благонравова А.С., Жилыева Т.В., Квашнина Д.В. [✉]

Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия

Аннотация

Первая часть обзора литературы, посвященного роли нарушений кишечной микробиоты в патогенезе расстройств аутистического спектра (РАС), включает последние опубликованные данные об особенностях количественного и качественного состава кишечной микробиоты у пациентов с аутизмом. Показано, что при РАС обнаружено избыточное присутствие *Clostridium* spp., представлены данные, свидетельствующие о возможном участии этих бактерий в развитии симптомов аутизма. Приведены противоречивые результаты исследований об увеличении численности ряда других патогенных бактерий и, наоборот, снижении количества бактерий, необходимых для поддержания нормального функционирования кишечника и организма хозяина в целом. Сообщается о возможной роли *Candida albicans* при РАС, требующей дальнейшего изучения. Обсуждаются возможные причины противоречий в результатах исследований, посвященных данной теме.

Ключевые слова: расстройства аутистического спектра, микробиота, клостридии, дисбиоз

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания № 056-00057-20-02 на тему «Трансплантация кишечной микробиоты при расстройствах аутистического спектра (РАС) у детей» (регистрационный номер: АААА-А20-120022590145-1, утверждено Министерством здравоохранения Российской Федерации 22.01.2020).

Для цитирования: Благонравова А.С., Жилыева Т.В., Квашнина Д.В. Нарушения кишечной микробиоты при расстройствах аутистического спектра: новые горизонты в поиске патогенетических подходов к терапии. Часть 1. Особенности кишечной микробиоты при расстройствах аутистического спектра. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021; 98(1): 65–72. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-62>

Review article
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-62>

Dysbiosis of intestinal microbiota in autism spectrum disorders: new horizons in search for pathogenetic approaches to therapy. Part 1. Features of intestinal microbiota in autism spectrum disorders

Anna S. Blagonravova, Tatyana V. Zhilyaeva, Darya V. Kvashnina [✉]

Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia

Abstract

The first part of the literature review on the role of intestinal microbiota dysbiosis in the pathogenesis of autism spectrum disorders (ASD) includes recent data published in the literature on the features of the quantitative

and qualitative composition of the intestinal microbiota in patients with autism. It was shown that an excessive presence of *Clostridium* was detected in ASD, and evidence was presented showing the possible participation of these bacteria in the development of autism symptoms. Contradictory research results on an increase in a number of other pathogenic bacteria and, conversely, a decrease in the number of bacteria necessary to maintain the normal functioning of the intestine and the host organism as a whole are presented. The possible role of *Candida albicans* in ASD, requiring further study, is reported. Possible causes of contradictions in the results of studies on this topic are discussed.

Keywords: *autism spectrum disorders, microbiota, clostridia, dysbiosis*

Financing. The work was carried out within the framework of the State assignment No. 056-00057-20-02, approved by the Ministry of Health of the Russian Federation on January 22, 2020, on the topic «Gut microbiota transplantation in children with autism spectrum disorders (ASD)» (registration number: AAAA-A20-120022590145-1).

For citation: Blagonravova A.S., Zhilyaeva T.V., Kvashnina D.V. Dysbiosis of intestinal microbiota in autism spectrum disorders: new horizons in search for pathogenetic approaches to therapy. Part 1. Features of intestinal microbiota in autism spectrum disorders. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(1):65–72. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-62>

Введение

Несмотря на большую распространенность и увеличение заболеваемости расстройствами аутистического спектра (РАС), не существует официально одобренных методов лечения ключевых симптомов аутизма, что, вероятно, связано с дефицитом сведений об этиологии и патогенезе этой весьма гетерогенной группы расстройств. При этом в последние десятилетия в большом количестве исследований выявлена ассоциация между дисбиозом кишечника и поведенческими симптомами у пациентов с РАС и другими нейropsychическими расстройствами.

Значительная доля детей и взрослых с аутизмом испытывают гастроинтестинальные (ГИ) проблемы (запор, диарея, хроническая абдоминальная боль и др.), сопутствующие психопатологическим симптомам [1] и коррелирующие с тяжестью РАС [2]. В.О. McElhanon и соавт. в результате проведенного метаанализа сделали вывод о трехкратном статистически значимом увеличении риска ГИ-симптомов у детей с РАС по сравнению со здоровыми детьми [1]. Согласно другим исследованиям, около 40% пациентов с РАС имеют ГИ-жалобы [3].

Гипотетически нарушения микробиоценоза кишечника, ассоциированные с ГИ-проблемами, у детей с генетической предрасположенностью к РАС могут усиливать проявления аутистического фенотипа или тяжесть поведенческих симптомов [4]. Согласно ряду исследований, у детей с сочетанием РАС и ГИ-расстройств отмечаются более тяжелые тревога, раздражительность и социальная изоляция по сравнению с детьми с РАС без ГИ-расстройств [5]. В исследовании CHARGE (Childhood Autism Risks from Genetics and Environment) частота ГИ-нарушений была ассоциирована с более выраженным аутистическим поведением, измеренным с помощью Aberrant Behaviour Checklist. С другой стороны, тяжесть аутизма, измеренная с помощью Autism Treatment Evaluation Checklist (АТЕС), коррелировала с индексом более тяжелых ГИ-нарушений [1]. Таким образом, тяжесть поведенческих

симптомов ассоциирована с риском возникновения ГИ-проблем и наоборот [6], но причинно-следственная связь в исследованиях такого типа остается не изученной.

ГИ-симптомы могут быть частично связаны с дисбиозом микробиоты кишечника (МК) [7]. При этом нельзя исключить, что МК оказывает влияние как на функционирование желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), так и на нейробиологическое состояние (собственно симптомы аутизма) за счет нескольких механизмов, в частности продуцируемых микроорганизмами метаболитов, модулирующих работу центральной нервной системы [8]. Гипотеза о роли МК в патогенезе аутизма поддерживается исследованиями, в которых показано, что манифестация аутизма часто сопровождается ГИ-жалобами и ей предшествует использование антибиотиков: многие дети с РАС часто проходят антибиотикотерапию в течение первых 3 лет жизни, что, предположительно, дестабилизирует их МК и открывает возможности для конкурентных потенциальных патогенов вносить вклад в тяжесть РАС [9, 10]. Кроме того, показано, что пероральный прием ванкомицина приводит к улучшению симптомов [11].

Ряд исследователей сфокусировались на изменениях в МК как на факторе риска для индивидумов, генетически предрасположенных к РАС; считается, что эти изменения в МК повышают риск развития РАС, влияя на иммунную систему и обмен веществ [12].

Данный обзор литературы, включающий три сообщения, посвящен оценке современного состояния исследований о роли МК в этиологии и патогенезе РАС, а первая его часть — анализу опубликованных данных об особенностях состава МК у пациентов с РАС. Кишечный микробиом детей с аутизмом отличается от такового у нейротипичных сиблингов и здоровых детей. Кроме того, различия выявлены между собственно аутизмом и другими РАС, которые не соответствуют полным диагностическим критериям аутизма (первазивное расстройство развития без дополнительных уточнений) [13].

Согласно первым исследованиям, МК при РАС характеризуется увеличенным количеством микрофлоры и сниженным микробным разнообразием; авторы предполагали, что комбинация этих факторов может привести к чрезмерному росту патогенных бактерий, способствуя выраженности симптомов аутизма [14]. Однако в дальнейших исследованиях получены не столь однозначные результаты.

При сравнении микробного разнообразия МК детей с РАС и здорового контроля в ряде исследований сообщают о его повышении при РАС [15, 16], в других — о снижении микробного разнообразия в кишечнике при аутизме [17, 18]. Наконец, согласно другим исследованиям, значимых различий в разнообразии кишечной микрофлоры между пациентами с РАС и здоровым контролем не отмечается [19, 20].

Обнаружено, что у детей с РАС и их сиблингов по сравнению со здоровыми детьми более распространены микроорганизмы родов *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Caloramator*, *Alistipes*, *Sarcina*, *Akkermansia*, семейств *Sutterellaceae* и *Enterobacteriaceae* [12, 15, 21].

Клостридии

Согласно данным F. Mangiola и соавт., качественный состав образцов фекалий у детей с аутизмом характеризуется большим количеством *Clostridium spp.* (в 10 раз больше, чем у здорового контроля) [22]. В серии случаев, описанной S.M. Finegold и соавт., проведен сравнительный анализ МК у 13 детей с аутизмом и таковой у 9 детей без заболевания: у детей с аутизмом выявлены большие численность и разнообразие видов клостридий, чем в контроле [23]. Повышенный уровень клостридий был также обнаружен у пациентов с РАС в нескольких исследованиях с использованием методов *16S rRNA* пиросеквенирования [3, 24–27] и ПЦР в режиме реального времени: уровень 3 кластеров клостридий (I, XI и XIVab) и одного специфического вида клостридий (*Clostridium boltea*) был статистически значимо выше при РАС [28].

Дальнейшие исследования с использованием ПЦР в режиме реального времени также сообщают о повышении уровня клостридий кластера I при РАС [29]. При использовании флюоресцентной *in situ* гибридизации обнаружено увеличение уровня *Clostridium histolyticum* в фекалиях пациентов с РАС по сравнению со здоровым контролем, при этом здоровые сиблинги детей с РАС также имели более высокие уровни *Clostridium histolyticum*, чем здоровый контроль [30].

Обилие *Clostridium perfringens* в фекалиях у детей с аутизмом также было подтверждено несколькими исследованиями [25, 28, 30]. В исследовании F. Strati и соавт. показано, что ГИ-проблемы у детей с РАС ассоциированы с высоким

содержанием клостридий [31]. В.L. Williams и соавт. обнаружили, что увеличение уровня бактерий порядка *Clostridiales* в значительной степени объясняется увеличением количества микроорганизмов из семейств, входящих в данный порядок: *Lachnospiraceae* и *Ruminococcaceae* [32]. Согласно исследованию D.R. Rose и соавт., уровни *Lachnospiraceae* и *Ruminococcaceae* увеличены у детей с РАС с ГИ-симптомами по сравнению с детьми контрольной группы с похожими симптомами [5]. J. Pulikkan и соавт. также в их работе отмечают повышение содержания бактерий семейства *Ruminococcaceae* [19], в то время как S. Liu и соавт. обнаружили, что уровень *Ruminococcaceae* при РАС значимо снижен [33].

Возможная роль *Clostridium spp.* в этиопатогенезе аутизма была впервые предложена в 1998 г. Ellen Bolte, матерью ребенка с регрессивным аутизмом, которая отметила начало поведенческих изменений после повторных курсов антибиотиков и последовавшей за этим хронической диареи [34, 35]. Наблюдая аналогичные случаи, она в общих чертах обрисовала возможность подострой хронической клостридиальной кишечной инфекции, которая может лежать в основе патогенеза аутизма у отдельных пациентов [34].

В пользу гипотезы о том, что изменение кишечного микробиоценоза с превалированием титра клостридий является потенциальным фактором риска развития РАС, свидетельствуют результаты исследования, в котором дети с регрессивным аутизмом получали 6-недельный пероральный курс ванкомицина (к которому чувствительны клостридии), что привело к значительному улучшению как нейроповеденческих, так и желудочно-кишечных симптомов [36]. Авторы предположили, что изменение состава облигатной микрофлоры кишечника при РАС сопровождается колонизацией бактериями, продуцирующими нейротоксины. И это может отчасти способствовать развитию симптомов аутизма. Однако улучшение по окончании лечения, подтвержденное использованием многочисленных оценок до и после терапии, было кратковременным, что, вероятно, связано с устойчивостью к ванкомицину спор клостридий, которые по окончании курса лечения в условиях снижения колонизационной резистентности кишечника прорастали в вегетативную форму, продуцирующую токсины, с последующим развитием симптоматики [35, 37].

Клостридии способны продуцировать некоторые метаболиты, такие как фенолы, дериваты р-крезола и индола, потенциально токсичные для человека [38]; эти метаболиты были обнаружены в образцах фекалий детей с первазивным расстройством развития без дополнительных уточнений (вариант РАС) и в еще больших количествах в образцах детей с аутизмом [25].

Недавний обзор постулирует роль глифосата — распространенного в окружающей среде пестицида в патогенезе аутизма за счет его влияния на рост токсин-продуцирующих *Clostridium* spp. [39]. И действительно, известно, что *Clostridium perfringens* и *Clostridium botulinum* высокоустойчивы к глифосату, в отличие от других представителей МК, таких как бифидобактерии и лактобактерии. Таким образом, уровень глифосата может оказывать вредоносное влияние на ось кишечник–мозг и способствовать патогенезу аутизма через изменение микробиома и продукцию кластридиальных токсинов [39].

Другие бактерии

В целом ряде исследований показано, что при РАС также более распространены виды *Desulfovibrio* [16, 21, 29]. Более того, отмечена сильная корреляция *Desulfovibrio* spp. с тяжестью проявлений аутизма [29]. Микроорганизмы вида *Desulfovibrio* — анаэробные палочки, устойчивые к распространенным антибиотикам, таким как цефалоспорины. У детей с аутизмом чаще в анамнезе отмечаются инфекции среднего уха, в связи с которыми они получали большее количество антибиотиков, чем дети из групп контроля [40], что может приводить к чрезмерному росту *Desulfovibrio* spp., продуцирующих пропионовую кислоту [21] и другие важные метаболиты (например, липополисахариды), потенциально вовлеченные в патогенез РАС.

Представители филумов *Firmicutes*, *Bacteroidetes* и *Proteobacteria* были наиболее распространенными во всех исследованиях, хотя данные об их качественных и количественных соотношениях при РАС также значительно варьируют. Повышенное количество *Bacteroidetes* обнаружено у детей с РАС в 5 исследованиях [13, 16, 20, 25, 41]. По данным некоторых исследований, у детей с РАС отмечено значимое повышение соотношения *Firmicutes*/*Bacteroidetes* в связи со снижением *Bacteroidetes* [19, 31, 32], в других же исследованиях показано отсутствие различий по уровням *Bacteroidetes* и *Firmicutes* между РАС и нормой [26, 42].

S.M. Finegold и соавт. [16] выявили сниженные уровни содержания представителей фила *Firmicutes* и относительно высокую распространенность *Bacteroidetes*, продуцирующих короткоцепочечные жирные кислоты, в частности пропионовую кислоту, и благодаря этому способных влиять на ЦНС и поведение при аутизме, т.к. пропионовая кислота проникает через гематоэнцефалический барьер и может оказывать влияние на нейрональную ткань [16]. M. De Angelis и соавт. продемонстрировали, что распространенность *Firmicutes* снижена в фекальных образцах детей с аутизмом по сравнению со здоровыми детьми, но этих различий не было получено между образцами детей с другими типа-

ми РАС (первазивным расстройством развития без дополнительных уточнений) и здоровых детей [12].

У детей с РАС зарегистрирована также большая численность бактерий рода *Sutterella* [43, 44], в частности подтверждено наличие *Sutterella* spp. у более чем 50% детей с РАС и их полное отсутствие у контрольных детей. Микроорганизмы рода *Sutterella* были идентифицированы также при воспалительных заболеваниях кишечника, но в дальнейшем и у здоровых людей [45]. В настоящее время остается непонятным, являются ли они непатогенными представителями МК или же могут проявлять патогенность при определенных условиях. В двух других исследованиях обнаружено, что *Sutterella* spp. менее распространены при РАС [18, 46].

Бактерии *Sutterella* spp. связаны с метаболизмом слизистой оболочки, и данные об их ассоциации с РАС были подтверждены другими микробиологическими исследованиями кала у детей с РАС [44]. Однако в нескольких случаях различия не были статистически значимыми между пациентами с аутизмом и их сиблингами. Поскольку имеется большое количество множественных семейных случаев РАС, была выдвинута гипотеза о том, что дети с аутизмом могут передавать свою фекальную микробиоту своим сиблингам и другим тесно контактирующим сверстникам, что приводит к развитию аутизма у предрасположенных детей [16]. Об этом также могут свидетельствовать результаты S.V. Gondalia и соавт. [47], которые показали отсутствие клинически значимых различий в характеристиках МК между детьми, страдающими аутизмом, и их нейротипическими сиблингами.

В трех исследованиях сообщалось, что уровень лактобацилл был значительно выше при РАС [19, 29, 31]. Особенно примечательно 32-кратное превышение *Lactobacillus* spp. у детей с РАС по сравнению со здоровыми детьми, полученное в исследовании J. Pulikkan и соавт. [19].

Имеются весьма многочисленные данные о снижении при аутизме уровней бактерий рода *Bifidobacterium* [16, 24, 25], которые могут оказывать защитное действие благодаря своим противовоспалительным свойствам. Но в двух работах сообщалось о значимом увеличении *Bifidobacterium* spp. [19, 27]. Лактобациллы и бифидобактерии обычно используются в пробиотических добавках. Поэтому применение пробиотиков может способствовать увеличению числа этих бактерий. Однако использовались ли пробиотики пациентами в начале исследования, в соответствующих публикациях не уточняется.

В нескольких исследованиях сообщалось о снижении уровней *Prevotella* spp. при РАС, а также бактерий рода *Coprococcus* и семейства *Veillonellaceae*, ответственных за переваривание и ферментацию углеводов [17, 18, 31, 42]. Низкая распространенность *Prevotella* spp. — комменсального микроор-

ганизма, участвующего в метаболизме сахаридов и в биосинтезе витаминов, обнаружена также в слюнных пробах людей с РАС [40]. Поскольку считается, что у пациентов с аутизмом нарушено усвоение углеводов, восстановление относительного дефицита *Prevotella* spp. может иметь терапевтический потенциал для симптомов РАС [40]. При этом J. Plaza-Díaz и соавт. [27] выявили значительное повышение уровня *Prevotella* spp. при РАС.

L. Wang и соавт. [48] обнаружили снижение распространенности *Akkermansia muciniphila* у пациентов с РАС относительно контроля. *A. muciniphila* является муцин-деградирующей бактерией, обычно присутствующей в больших количествах в здоровом кишечнике. Таким образом, ее отсутствие может способствовать изменению барьерной функции слизи. И наоборот, сообщалось также о повышенных уровнях бактерий рода *Akkermansia* при РАС [15]. J. Plaza-Díaz и соавт. [49] на основании комплексного обследования 48 детей в возрасте 2–6 лет с РАС и их 57 здоровых сверстников с применением метагеномного подхода и использованием платформы секвенирования следующего поколения выявили, что *Actinobacteria*, *Proteobacteria* на уровне фила, а *Bacilli*, *Erysipelotrichia* и *Gammaproteobacteria* на классовом уровне были обнаружены в более высоких концентрациях у детей с РАС.

Перспективным методом комплексного изучения пациентов с РАС является анализ метагенома, основанный на построении метагеномных сигнатур, который позволяет оценить функциональные изменения в МК и нейромодулирующий потенциал МК человека [50]. Одним из передовых исследований с применением данного метода является работа группы российских ученых. По результатам метагеномного анализа с применением разработанного ими биоинформатического алгоритма были выявлены статистически значимые различия в таксономическом и геномном составе МК детей с РАС относительно группы нейротипичных детей. Показано пониженное содержание родов *Barnesiella* и *Parabacteroides*, видов *Alistipes putredinis*, *Bacteroides intestinhominis*, *Eubacterium rectale*, *Parabacteroides distasonis* и *Ruminococcus lactaris*, а также увеличение представленности бактерий вида *Bacteroides stercoris* [50].

Другие микроорганизмы

Дисбиоз кишечника при РАС характеризуется количественными и качественными изменениями не только бактериальной, но и грибковой составляющей [15, 31, 51]. *Candida albicans* в ЖКТ в 2 раза чаще встречаются у детей с РАС (они высеваются у 57,5% пациентов с аутизмом), чем у здоровых детей, причем обнаруживаются агрессивные формы с псевдогифами, что говорит о возможности их облегченной адгезии к слизистой кишечника [51].

Грибы рода *Candida* могут выделять аммиак, d-арабинитол и другие токсины, вызывая аутистическое поведение [51]. Роль грибов в патогенезе РАС не была четко выяснена, и необходимы дополнительные исследования с большими выборками, т.к. исследования, проведенные в последние годы, свидетельствуют о вероятном значимом влиянии этого типа микрофлоры. Большее количество грибковой флоры у пациентов с РАС может быть лишь следствием изменений в балансе бактериальной микробиоты и не иметь отношения к нейropsychологическим симптомам, но, с другой стороны, наличие синтезируемых *C. albicans* токсинов, способных проникать через кишечную стенку, требует пристального дальнейшего изучения этой темы. Кроме того, согласно отдельным гипотезам, избыточная колонизация кишечника новорожденного *C. albicans*, полученными от матери при родах, может нарушать формирование нормальной бактериальной микрофлоры.

Обсуждение

Как можно видеть из приведенных выше результатов многочисленных исследований, несмотря на большое количество публикаций по дисбиозу МК при РАС, до сих пор нет единого мнения относительно точного состава микробиома кишечника, специфичного для людей с РАС, не говоря уже о том, что некоторые исследования описывают прямо противоположные результаты [15].

Причиной противоречий может быть отсутствие однородности с точки зрения демографических характеристик, диеты, фармакологического лечения участников, географической области исследований, сопутствующих заболеваний, тяжести поведенческих и ГИ-симптомов среди включенных пациентов, а также методологии исследований. Например, микробиота фекалий молодых людей содержит пропорционально меньше бактерий, принадлежащих филу *Bacteroidetes*, по сравнению с пожилыми людьми [52], и профиль микробиома может варьировать в зависимости от участка ЖКТ, из которого была взята проба [28]. Следовательно, для правильного сравнения и оценки результатов необходимо исследования с однородными группами пациентов. По той же причине — большой разнородности в подходах к исследованию данной темы — в настоящее время практически нет метаанализов, которые бы позволили обобщить имеющиеся данные.

Наличие ГИ-симптомов является важным вмешивающимся фактором при изучении МК и РАС, т.к. желудочно-кишечные нарушения сами по себе, независимо от биологических механизмов, из-за кишечного дискомфорта могут влиять на поведение детей с РАС [53].

Очевидна необходимость исследований каузальности взаимоотношений МК и поведенческих нарушений, т.к. на настоящий момент существуют

преимущественно гипотезы. Для этого, вероятно, необходимы не кросс-секционные исследования, а исследования с проспективным дизайном, оценкой МК с момента новорожденности до возникновения симптомов РАС, а также исследования с интервенцией с длительным динамическим наблюдением состава МК и оценкой в динамике психопатологического состояния пациента.

Огромным препятствием на пути к пониманию проблемы служит также то, что РАС не является заболеванием с единым механизмом патогенеза, это спектр, целая группа психических расстройств, имеющих разные молекулярные механизмы патогенеза. Поэтому гипотетически в разных случаях РАС роль МК в формировании психопатологических расстройств может быть принципиально различной: от минимальной и клинически незначимой (как результат особых пищевых предпочтений пациента) до максимальной патогенетически значимой (когда манифестация симптомов является преимущественным результатом тяжелого кишечного дисбиоза при наличии определенной генетической предрасположенности к психическому расстройству).

Вероятно, до тех пор, пока не будут преодолены современные трудности в классификации психических расстройств (пока не произойдет перехода от описательного подхода с опорой на внешние фенотипические признаки к подходу на основе патогенеза и с опорой на молекулярные механизмы развития заболевания), вопрос, каким образом гомогенизировать выборки в исследованиях РАС, останется актуальным. Но в то же время перехода к патогенетической классификации не произойдет, пока не будет получено достаточное количество данных о различных факторах этиологии и патогенеза.

Этот замкнутый круг в настоящее время может быть преодолен благодаря использованию исследовательского подхода с описанием максимального количества данных о пациентах, включенных в исследование, в том числе с применением новых технологий: методов секвенирования нового поколения, метаболомики с интегрированием данных транскриптомики и протеомики, а также тщательным психопатологическим описанием участников исследования стандартизированными валидизированными методами. Кроме того, учитывая большую роль в развитии РАС нарушений индивидуального развития организма на каком-либо этапе онтогенеза, очевидной становится необходимость обследования пар мать пациента–пациент для оценки возможного вклада факторов, влияющих на внутриутробное развитие плода. При этом оптимальным при этом был бы проспективный динамический дизайн исследований, в котором наблюдения проводятся с самых ранних этапов онтогенеза. Это могут быть либо исследования больших выборок из общей популяции, либо прицельные исследования семей, в

которых уже есть пациенты с РАС. Подобный подход поможет более детально изучить некоторые дополнительные механизмы развития аутизма. Так, согласно одной из теорий, трансплацентарное поступление избытка некоторых аутоантител матери класса IgG к плоду ведет к патологической «перенастройке» его иммунной системы (по механизмам материнского иммунного импринтинга) [54, 55]. Иммунные сдвиги у беременной женщины, проявляющиеся изменениями продукции аутоантител и цитокинов, могут быть вызваны разными факторами среды, в том числе микроэкологическими нарушениями пищеварительного и вагинального тракта, инфекциями и др. [54, 55]. Трудности, связанные с большими объемами данных в таких исследованиях, трудозатратностью и высокой стоимостью методов исследования, могут быть преодолены в междисциплинарном подходе с привлечением исследователей из разных научных сфер и географических регионов.

Заключение

Таким образом, представляется актуальным дальнейшее изучение особенностей МК при РАС, поскольку имеющиеся к настоящему времени данные говорят о возможной этиопатогенетической роли кишечного дисбиоза в развитии симптомов аутизма. При этом большое количество противоречий в имеющихся к настоящему времени данных, гетерогенность состояний, включенных в понятие РАС, многофакторность этиологии этих состояний требуют обширных исследований со сложным дизайном и максимальной стандартизацией оценок как биологических показателей, так и психопатологических симптомов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ / REFERENCES

1. McElhanon B.O., McCracken C., Karpen S., Sharp W.G. Gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder: a meta-analysis. *Pediatrics*. 2014; 133(5): 872–83. <https://doi.org/10.1542/peds.2013-3995>
2. Chaidez V., Hansen R.L., Hertz-Picciotto I. Gastrointestinal problems in children with autism, developmental delays or typical development. *J. Autism Dev. Disord.* 2014; 44(5): 1117–27. <https://doi.org/10.1007/s10803-013-1973-x>
3. Wang M., Wan J., Rong H., He F., Wang H., Zhou J., et al. Alterations in gut glutamate metabolism associated with changes in gut microbiota composition in children with autism spectrum disorder. *mSystems*. 2019; 4(1): e00321-18. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00321-18>
4. De Theije C.G., Wu J., da Silva S.L., Kamphuis P.J., Garssen J., Korte S.M. Pathways underlying the gut-to-brain connection in autism spectrum disorders as future targets for disease management. *Eur. J. Pharmacol.* 2011; 668(Suppl. 1): S70–80. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.07.013>
5. Rose D.R., Yang H., Serena G., Sturgeon C., Ma B., Careaga M., et al. Differential immune responses and microbiota profiles in children with autism spectrum disorders and co-morbid gastrointestinal symptoms. *Brain Behav. Immun.* 2018; 70: 354–68. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.03.025>

6. Adams J.B., Audhya T., McDonough-Means S., Rubin R.A., Quig D., Geis E., et al. Nutritional and metabolic status of children with autism vs. neurotypical children, and the association with autism severity. *Nutr. Metab. (Lond.)*. 2011; 8(1): 34. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-8-34>
7. Krajmalnik-Brown R., Lozupone C., Kang D.W., Adams J.B. Gut bacteria in children with autism spectrum disorders: challenges and promise of studying how a complex community influences a complex disease. *Microb. Ecol. Health Dis.* 2015; 26: 26914. <https://doi.org/10.3402/mehd.v26.26914>
8. Hsiao E.Y., McBride S.W., Hsien S., Sharon G., Hyde E.R., McCue T., et al. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopment disorders. *Cell*. 2013; 155(7): 1451–63. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.024>
9. Niehus R., Lord C. Early medical history of children with autism spectrum disorders. *J. Dev. Behav. Pediatr.* 2006; 27(2): S120–7. <https://doi.org/10.1097/00004703-200604002-00010>
10. Willing B.P., Russell S.L., Finlay B.B. Shifting the balance: antibiotic effects on host-microbiota mutualism. *Nat. Rev. Microbiol.* 2011; 9(4): 233–43. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2536>
11. Sekirov I., Russell S.L., Antunes C.M., Finlay B.B. Gut microbiomes in health and disease. *Physiol. Rev.* 2010; 90(3): 859–904. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2009>
12. De Angelis M., Francavilla R., Piccolo M., De Giacomo A., Gobetti M. Autism spectrum disorders and intestinal microbiota. *Gut Microbes*. 2015; 6(3): 207–13. <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1035855>
13. Coretti L., Paparo L., Riccio M.P., Amato F., Cuomo M., Natale A., et al. Gut microbiota features in young children with autism spectrum disorders. *Front. Microbiol.* 2018; 9: 3146. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03146>
14. Dethlefsen L., Huse S., Sogin M.L., Relman D.A. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol.* 2008; 6(11): e280. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060280>
15. Fattorusso A., Di Genova L., Dell’Isola G., Mencaroni E., Esposito S. Autism spectrum disorders and the gut microbiota. *Nutrients*. 2019; 11(3): 521. <https://doi.org/10.3390/nu11030521>
16. Finegold S.M., Dowd S.E., Gontcharova V., Liu C., Henley K.E., Wolcott R.D., et al. Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe*. 2010; 16(4): 444–53. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.06.008>
17. Kang D.W., Ilhan Z.E., Isern N.G., Hoyt D.W., Howsmon D.P., Shaffer M., et al. Differences in fecal microbial metabolites and microbiota of children with autism spectrum disorders. *Anaerobe*. 2018; 49: 121–31. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.12.007>
18. Kang D.W., Park J.G., Ilhan Z.E., Wallstrom G., LaBaer J., Adams J.B., et al. Reduced incidence of Prevotella and other fermenters in intestinal microflora of autistic children. *PLoS One*. 2013; 8(7): e68322. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068322>
19. Pulikkan J., Maji A., Dhakan D.B., Saxena R., Mohan B., Anto M.M., et al. Gut microbial dysbiosis in Indian children with autism spectrum disorders. *Microb. Ecol.* 2018; 76(4): 1102–14. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1176-2>
20. Son J.S., Zheng L.J., Rowehl L.M., Tian X., Zhang Y., Zhu W., et al. Comparison of fecal microbiota in children with autism spectrum disorders and neurotypical siblings in the Simons Simplex collection. *PLoS One*. 2015; 10(10): e0137725. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137725>
21. Finegold S.M. *Desulfovibrio* species are potentially important in regressive autism. *Med. Hypotheses*. 2011; 77(2): 270–4. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2011.04.032>
22. Mangiola F., Ianiro G., Franceschi F., et al. Gut microbiota in autism and mood disorders. *World J Gastroenterol.* 2016; (22): 361–368. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i1.361>
23. Finegold S.M., Molitoris D., Song Y., Liu C., Vaisanen M.L., Bolte E., et al. Gastrointestinal microflora studies in late-onset autism. *Clin. Infect. Dis.* 2002; 35(Suppl. 1): S6–16. <https://doi.org/10.1086/341914>
24. Berding K., Donovan S.M. Diet can impact microbiota composition in children with autism spectrum disorder. *Front. Neurosci.* 2018; 12: 515. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00515>
25. De Angelis M., Piccolo M., Vannini L., Siragusa S., De Giacomo A., Serrazanetti D.L., et al. Fecal microbiota and metabolome of children with autism and pervasive developmental disorder not otherwise specified. *PLoS One*. 2013; 8(10): e76993. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076993>
26. Ma B., Liang J., Dai M., Wang J., Luo J., Zhang Z., et al. Altered gut microbiota in Chinese children with autism spectrum disorders. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2019; 9: 40. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00040>
27. Plaza-Diaz J., Gomez-Fernandez A., Chueca N., Torre-Aguilar M.J., Gil A., Perez-Navero J.L., et al. Autism spectrum disorder (ASD) with and without mental regression is associated with changes in the fecal microbiota. *Nutrients*. 2019; 11(2): e337. <https://doi.org/10.3390/nu11020337>
28. Song Y., Liu C., Finegold S.M. Real-time PCR quantitation of clostridia in feces of autistic children. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70(11): 6459–65. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6459-6465.2004>
29. Tomova A., Husarova V., Lakatosova S., Bakos J., Vlkova B., Babinska K., et al. Gastrointestinal microbiota in children with autism in Slovakia. *Physiol. Behav.* 2015; 138: 179–87. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.10.033>
30. Parracho H.M., Bingham M.O., Gibson G.R., McCartney A.L. Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. *J. Med. Microbiol.* 2005; 54(Pt. 10): 987–91. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46101-0>
31. Strati F., Cavalieri D., Albanese D., De Felice C., Donati C., Hayek J., et al. New evidences on the altered gut microbiota in autism spectrum disorders. *Microbiome*. 2017; 5(1): 24. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0242-1>
32. Williams B.L., Hornig M., Buie T., Bauman M.L., Cho Paik M., Wick I., et al. Impaired carbohydrate digestion and transport and mucosal dysbiosis in the intestines of children with autism and gastrointestinal disturbances. *PLoS One*. 2011; 6(9): e24585. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024585>
33. Liu S., Li E., Sun Z., Fu D., Duan G., Jiang M., et al. Altered gut microbiota and short chain fatty acids in Chinese children with autism spectrum disorder. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 287. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36430-z>
34. Bolte E.R. Autism and *Clostridium tetani*. *Med. Hypotheses*. 1998; 51(2): 133–44. [https://doi.org/10.1016/S0306-9877\(98\)90107-4](https://doi.org/10.1016/S0306-9877(98)90107-4)
35. Ding H.T., Taur Y., Walkup J.T. Gut microbiota and autism: key concepts and findings. *J. Autism Dev. Disord.* 2017; 47(2): 480–9. <https://doi.org/10.1007/s10803-016-2960-9>
36. Sandler R.H., Finegold S.M., Bolte E.R., Buchanan C.P., Maxwell A.P., Väisänen M.L., et al. Short-term benefit from oral vancomycin treatment of regressive-onset autism. *J. Child Neurol.* 2000; 15(7): 429–35. <https://doi.org/10.1177/088307380001500701>
37. Yang Y., Tian J., Yang B. Targeting gut microbiome: A novel and potential therapy for autism. *Life Sci.* 2018; 194: 111–9. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.12.027>
38. Finegold S.M. Therapy and epidemiology of autism — clostridial spores as key elements. *Med. Hypotheses*. 2008; 70(3): 508–11. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2007.07.019>
39. Argou-Cardozo I., Zeidán-Chuliá F. Clostridium bacteria and autism spectrum conditions: a systematic review and hypothetical contribution of environmental glyphosate levels. *Med. Sci. (Basel)*. 2018; 6(2): 29. <https://doi.org/10.3390/medsci6020029>

40. Qiao Y., Wu M., Feng Y., Zhou Z., Chen L., Chen F. Alterations of oral microbiota distinguish children with autism spectrum disorders from healthy controls. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 1597. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19982-y>
41. Zhang M., Ma W., Zhang J., He Y., Wang J. Analysis of gut microbiota profiles and microbe-disease associations in children with autism spectrum disorders in China. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 13981. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32219-2>
42. Li N., Yang J., Zhang J., Liang C., Wang Y., Chen B., et al. Correlation of gut microbiome between ASD children and mothers and potential biomarkers for risk assessment. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2019; 17(1): 26–38. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2019.01.002>
43. Cryan J.F., Dinan T.G. Mind-altering microorganisms: The impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.* 2012; 13(10): 701–12. <https://doi.org/10.1038/nrn3346>
44. Williams B.L., Hornig M., Parekh T., Lipkin W.I. Application of novel PCR-based methods for detection, quantification, and phylogenetic characterization of *Sutterella* species in intestinal biopsy samples from children with autism and gastrointestinal disturbances. *mBio.* 2012; 3(1): e00261-11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00261-11>
45. Hiippala K., Kainulainen V., Kalliomäki M., Arkkila P., Sotkari R. Mucosal prevalence and interactions with the epithelium indicate commensalism of *Sutterella* spp. *Front. Microbiol.* 2016; 7: 1706. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01706>
46. Luna R.A., Oezguen N., Balderas M., Venkatachalam A., Runge J.K., Versalovic J., et al. Distinct microbiome-neuroimmune signatures correlate with functional abdominal pain in children with autism spectrum disorder. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 2016; 3(2): 218–30. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2016.11.008>
47. Gondalia S.V., Palombo E.A., Knowles S.R., Cox S.B., Meyer D., Austin D.W. Molecular characterisation of gastrointestinal microbiota of children with autism (with and without gastrointestinal dysfunction) and their neurotypical siblings. *Autism Res.* 2012; 5(6): 419–27. <https://doi.org/10.1002/aur.1253>
48. Wang L., Christophersen C.T., Sorich M.J., Gerber J.P., Angley M.T., Conlon M.A. Low relative abundances of the mucolytic bacterium *Akkermansia muciniphila* and *Bifidobacterium* spp. in feces of children with autism. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011; 77(18): 6718–21. <https://doi.org/10.1128/AEM.05212-11>
49. Plaza-Díaz J., Gómez-Fernández A., Chueca N., Torre-Aguilar M.J., Gil Á., Perez-Navero J.L., et al. Autism Spectrum Disorder (ASD) with and without mental regression is associated with changes in the fecal microbiota. *Nutrients.* 2019; 11(2): 337. <https://doi.org/10.3390/nu11020337>
50. Averina O.V., Kovtun A.S., Polyakova S.I., Savilova A.M., Rebrikov D.V., Danilenko V.N., et al. The bacterial neurometabolic signature of the gut microbiota of young children with autism spectrum disorders. *J. Med. Microbiol.* 2020; 69(4): 558–71. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001178>
51. Iovene M.R., Bombace F., Maresca R., Sapone A., Iardino P., Picardi A., et al. Intestinal dysbiosis and yeast isolation in stool of subjects with autism spectrum disorders. *Mycopathologia.* 2017; 182(3-4): 349–63. <https://doi.org/10.1007/s11046-016-0068-6>
52. Claesson M.J., Cusack S., O’Sullivan O., Greene-Diniz R., de Weerd H., Flannery E., et al. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011; 108(Suppl. 1): 4586–91. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000097107>
53. Bezawada N., Phang T.H., Hold G.L., Hansen R. Autism spectrum disorder and the gut microbiota in children: a systematic review. *Ann. Nutr. Metab.* 2020; 76(1): 1–14. <https://doi.org/10.1159/000505363>
54. Полетаев А.Б., Шендеров Б.А. Аутизм и аутоиммунитет: генетика или эпигенетика? *Клиническая патофизиология.* 2016; 22(4): 17–25. [Poletaev A.B., Shenderov B.A. Autism and autoimmunity: genetics or epigenetics? *Klinicheskaya patofiziologiya.* 2016; 22(4): 17–25. (in Russian)]
55. Poletaev A.B., Shenderov B.A. Autism: Genetics or Epigenetics? *ARC Journals of Immunology and Vaccines.* 2016; 1(2): 1–7.

Информация об авторах

Благодравова Анна Сергеевна — д.м.н., доц., проректор по научной работе, проф. каф. эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины ПИМУ, Нижний Новгород, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1467-049X>

Жилиева Татьяна Владимировна — к.м.н., доц. каф. психиатрии ПИМУ, Нижний Новгород, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6155-1007>

Квашнина Дарья Валерьевна — к.м.н., старший преподаватель каф. эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины ПИМУ, Нижний Новгород, Россия, daria_tsariova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9317-4816>

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

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

Статья поступила в редакцию 09.07.2020; принята к публикации 06.10.2020; опубликована 25.02.2021.

Information about the authors

Anna S. Blagonravova — D. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Vice-rector for research, prof., Department of epidemiology, microbiology and evidence-based medicine, Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1467-049X>

Tatyana V. Zhilyaeva — PhD. (Med.), Assoc. Prof., Department of psychiatry, Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6155-1007>

Darya V. Kvashnina — PhD. (Med.), senior lecturer, Department of epidemiology, microbiology and evidence-based medicine, Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia, daria_tsariova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9317-4816>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

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

The article was submitted 09.07.2020; accepted for publication 06.10.2020, published 25.02.2021.



Гетерогенность в изогенных популяциях бактерий и современные технологии клеточного фенотипирования

Андрюков Б.Г.[✉], Тимченко Н.Ф., Ляпун И.Н., Бынина М.П., Матосова Е.В.

НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, Владивосток, Россия

Аннотация

В рамках современной микробиологической парадигмы колонии генетически идентичных микроорганизмов рассматриваются как биосоциальные системы, состоящие из нескольких гетерогенных клональных кластеров клеток (фенотипов бактерий), которые по-разному реагируют на изменения в окружающей среде. За последние десятилетия фенотипическая гетерогенность обнаружена во всех изогенных популяциях патогенных бактерий. Она обеспечивает избирательное преимущество клеточных фенотипов при изменениях физико-химических параметров среды обитания и конкурентном взаимодействии с другими микроорганизмами. Установлено, что данной адаптационной стратегией бактерий управляют разнообразные механизмы вне- и внутриклеточного генеза. Гетерогенность в бактериальных сообществах имеет большое значение для выживания патогенных бактерий в организме-хозяине, прогрессирования и персистенции инфекций, а также снижения эффективности антибиотикотерапии. Современный спектр аналитических инструментов для изучения клеточного фенотипирования представлен как методами оптической визуализации и качественной структурной характеристики одиночных клеток, так и омиксными технологиями количественного анализа и мониторинга молекулярных внутриклеточных процессов. Эти разнообразные инструменты позволяют не только выявлять и модулировать фенотипическую гетерогенность в изогенных популяциях бактерий, но и оценивать функциональную значимость клеточных фенотипов для развития инфекционного процесса. Целью обзора является интеграция современных представлений о гетерогенности в изогенных популяциях бактерий с акцентом на представлении современных аналитических технологий оценки и мониторинга фенотипирования одиночных клеток.

Ключевые слова: бактерии, изогенные популяции, фенотипическая гетерогенность, клеточное фенотипирование, современные технологии, одиночные клетки

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания по теме НИР № 0545-2019-0007 «Молекулярные механизмы образования устойчивых некультивируемых форм бактерий».

Для цитирования: Андрюков Б.Г., Тимченко Н.Ф., Ляпун И.Н., Бынина М.П., Матосова Е.В. Гетерогенность в изогенных популяциях бактерий и современные технологии клеточного фенотипирования. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2021; 98(1): 73–83. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-33>

Heterogeneity in isogenic bacteria populations and modern technologies of cell phenotyping

Boris G. Andryukov[✉], Nelly F. Timchenko, Irina N. Lyapun, Marina P. Bynina, Ekaterina V. Matosova

Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia

Abstract

In the framework of the modern microbiological paradigm, colonies of genetically identical microorganisms are considered as biosocial systems consisting of several heterogeneous clonal cell clusters (bacterial phenotypes) that respond differently to changes in the environment. Phenotypic heterogeneity was found in recent decades in all isogenic populations of pathogenic bacteria. Such heterogeneity provides a selective advantage of cellular phenotypes with changes in the physicochemical parameters of the environment and competitive interaction with other microorganisms. Heterogeneity in bacterial communities is of great importance for the survival of pathogenic bacteria in the host organism, the progression and persistence of infections, as well as the decrease in the effectiveness of antibiotic therapy. The modern spectrum of analytical tools for studying cellular phenotyping is presented both by optical imaging methods and qualitative structural characteristics of single cells, and by omic technologies of quantitative analysis and monitoring of molecular intracellular processes. These diverse tools make

it possible not only to identify and modulate phenotypic heterogeneity in isogenic bacterial populations, but also to evaluate the functional significance of cellular phenotypes in the development of the infectious process. The aim of the review is the integration of modern concepts of heterogeneity in isogenic bacterial populations, with an emphasis on the presentation of modern analytical technologies for assessing and monitoring phenotypic typing of single cells.

Keywords: *bacteria, isogenic populations, phenotypic heterogeneity, cell phenotyping, modern technologies, single cells*

Funding. The work was carried out within the framework of the state assignment on the topic of research work No. 0545-2019-0007 "Molecular mechanisms of the formation of stable uncultivated forms of bacteria."

For citation: Andryukov B.G., Timchenko N.F., Lyapun I.N., Bynina M.P., Matosova E.V. Heterogeneity in isogenic bacteria populations and modern technologies of cell phenotyping. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(1):73–83. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-33>

Введение

Бактериальные колонии традиционно рассматривались как клональные популяции идентичных клеток, которые обладают схожими морфологическими, биохимическими и генетическими свойствами и патогномичными признаками для их идентификации. Неслучайно для фундаментальных исследований по классической генетике и физиологии обычно использовали колониальные и периодические культуры бактерий, исходя из предположения о популяционной идентичности всех клеток [1–3].

С позиции современной микробиологической парадигмы колонии микроорганизмов рассматриваются как биосоциальные системы, состоящие из нескольких гетерогенных клональных кластеров клеток (фенотипов бактерий) [1, 3, 4]. В последние десятилетия четко обозначилась тенденция системного подхода в изучении биологических явлений и процессов в бактериях, включая транскриптомику, протеомику и метаболомику одиночных клеток. В связи с этим повысилась актуальность интеграции регуляторных (фенотипических) и мутационных (генетических) адаптационных реакций бактерий на изменившиеся условия окружающей среды, а также комплексного исследования гетерогенности этих трансформаций и их вклада в эволюцию [5, 6].

Для сохранения жизнеспособности отдельных бактерий и всей популяции, обитающих в меняющихся условиях окружающей среды, формирование гетерогенных фенотипов имеет большое значение благодаря расширению спектра используемых адаптационных стратегий [2, 3, 6]. Таким образом, значение фенотипической гетерогенности в изогенных популяциях патогенных бактерий заключается в регуляции экспрессии генов, развитии инфекционного процесса и формировании резистентности к антибиотикам [3, 7].

Однако, несмотря на интенсивные исследования гетерогенности в последние десятилетия, еще остаются вопросы, связанные с раскрытием механизмов, ответственных за формирование диверсификаций в популяциях, а также процессов

их регуляции микробным сообществом [3, 4, 6, 8]. До настоящего времени сохранилось несоответствие между механистическим пониманием гетерогенности и использованием аналитических инструментов для мониторинга и оценки этого явления на уровне отдельных клеток [3, 6, 9, 10].

Целью обзора является интеграция современных концепций гетерогенности в изогенных популяциях бактерий с акцентом на представлении современных аналитических технологий оценки и мониторинга фенотипирования одиночных клеток.

Фенотипическая гетерогенность изогенных популяций бактерий

Гетерогенность (пластичность, диверсификация) в изогенной популяции проявляется в различиях свойств отдельных фенотипов бактериальных клеток. Она может быть представлена би(мульти)модальным распределением морфологических параметров клеток: формы, размера, структуры, скорости роста, активности метаболизма и др. [5, 11]. Различия в фенотипах симпатрических изогенных популяций обычно имеют характер гауссова распределения и изучаются на уровне отдельных клеток [8, 12–14].

Следовательно, основные характеристики видов бактерий, полученные в ходе изучения популяций традиционными микробиологическими или аналитическими методами, носят усредненный характер и не способны в полной мере отобразить величину гетерогенности [6, 7, 14].

Ранее считалось, что единственным источником биологического разнообразия являются генетические мутации, которые опосредуют эволюцию. С позиции современной концепции фенотипической гетерогенности популяции эволюция является результатом естественного отбора, действующего на различные клеточные фенотипы бактерий. Они определяются как жесткой базовой последовательностью генома, так и более пластичными паттернами экспрессии отдельных генов [8, 9, 15–17].

Обоснование такой концепции связано с многочисленными примерами участия фенотипических адаптационных реакций в эпигенетическом насле-

довании и клеточной регуляции репарации ДНК [8, 18], с влиянием на персистенцию бактерий стохастических и детерминированных процессов [9, 15], повышающих потенциал жизнеспособности бактерий и сохранения популяции.

Например, способность бактерий выживать при воздействии антибиотиков без мутации (фенотипическая резистентность) традиционно рассматривается как следствие бактериальной реакции на сигналы окружающей среды [15, 19]. Однако эта устойчивость может возникнуть и в отсутствие внешних раздражителей. Межклеточные флуктуации и стохастические процессы формируют гетерогенность в микробной популяции. Это связано с появлением ненаследуемого клеточного фенотипа устойчивых некультивируемых клеток, которые обладают резистентностью к любому классу антибиотиков и способностью ограничивать эффективность лечения [19].

В отличие от генетической изменчивости, связанной с необратимыми мутациями, фенотипическая гетерогенность является следствием бактериального ответа на случайные модуляции параметров окружающей среды, старение клеток, межклеточное взаимодействие, а также стохастичность («биологический шум») в экспрессии генов.

Взаимодействуя друг с другом, данные причины модулируют диверсификацию ответов в бактериальных субпопуляциях. Специфический ответ клеточного фенотипа может влиять на жизнеспособность или устойчивость культуры при изменившихся условиях окружающей среды. Это может быть исследовано с учетом специфики ответной реакции [6, 7, 20–23].

Динамическое развитие и применение современных аналитических технологий с более высоким пространственно-временным разрешением позволяет маркировать, сортировать и проводить избирательные исследования гетерогенных фенотипов в сочетании с методами анализа одиночных клеток (фенотипированием). Это дает возможность не только обнаружить и модулировать фенотипическую гетерогенность в бактериальных популяциях, но и оценить ее функциональную значимость в развитии инфекционного процесса. Кроме того, полученные сведения помогут обеспечить целевое применение инновационных антимикробных стратегий [20, 21, 23, 24].

Современные аналитические технологии фенотипирования для мониторинга и оценки гетерогенности в популяциях бактерий

Фенотипическая гетерогенность бактериальных популяций является ключевым фактором формирования устойчивости патогенов к антимикробным средствам и возникновения инфекций. Поэто-

му в последние годы использование традиционных методов изучения биологических свойств бактерий, оценивающих их общие популяционные характеристики, устарело [20]. Однако количественная молекулярная характеристика негенетических фенотипов и их типирование в бактериальных популяциях стали возможными относительно недавно, с развитием современных аналитических технологий визуализации и анализа из арсенала микробиологии одиночных клеток [25–27].

С конца XX в. спектр методов, доступных для изучения гетерогенности биологических процессов в одиночных клетках, постоянно расширяется. Примерами хорошо охарактеризованных и изученных бактериальных фенотипов служат дормантные клеточные формы [7, 24], субтипы *Bacillus cereus*, которые являются продуцентами цитотоксина К [28], и подгруппы клеток в культуре *Salmonella typhimurium*, экспрессирующие флагеллин [29].

Развитие аналитических технологий фенотипирования шло параллельно с совершенствованием методов выделения и иммобилизации одиночных клеток для исследования. Сегодня используемые для этого экспериментальные инструменты включают как традиционные приемы (серийные разведения, физическое улавливание) и относительно новые (работа с проточной суспензией, флюоресцентная сортировка), так и современные технологии (применение микрофлюидных устройств, магнитной сепарации) [9, 10, 25].

Совершенствование приёмов мониторинга и оценки фенотипической гетерогенности в бактериальных популяциях шло по пути повышения чувствительности и производительности методов. Эти инструменты позволяли за короткое время исследовать большое количество (десятки тысяч) одиночных клеток и получать количественные результаты, позволяющие установить связь между гетерогенностью популяций и функциональностью фенотипов [9, 30].

Современный спектр аналитических инструментов клеточного фенотипирования представлен методами оптической визуализации, которые позволяют исследовать качественные (структурные) характеристики одиночных клеток, и омиксными технологиями количественного анализа и мониторинга молекулярных внутриклеточных процессов [10, 12, 30].

В общем виде развитие аналитических технологий фенотипирования клеток арсенала SCM шло в четырех направлениях (рисунок):

- биофизическая характеристика клеток;
- оценка экспрессии отдельных генов;
- анализ специфических белков;
- исследование метаболитов.

В 2021 г. будет 45 лет, как Т. Hirschfeld и его коллеги впервые приобрели опыт успешного при-



Современные технологии фенотипирования для мониторинга и оценки гетерогенности бактериальных популяций.
Modern phenotypic technologies for monitoring and evaluating heterogeneity in bacterial populations.

менения количественной оптической визуализации цитоплазматических белковых молекул *Escherichia coli* [12]. Тем самым динамическая природа внутриклеточных молекулярных процессов в различных условиях роста, физиологии и стресса бактерий впервые была подтверждена экспериментально на уровне отдельных клеток, а новая технология и ее авторы оказались у истоков зарождения протеомики [12, 31, 32].

Это исследование явилось ключевым в развитии аналитических технологий количественной оптической визуализации гетерогенности биологических процессов в бактериальной клетке, что стало началом новой эпохи в молекулярной микробиологии [31, 32].

Чаще всего в современных исследованиях для фенотипирования применяются специализированные репортерные штаммы и флуоресцентные красители. Изучение микро- и наноразмерных паттернов одиночных клеток бактерий и мониторинг их функциональности с высоким временным и пространственным разрешением позволяют измерять количество копий мРНК или молекул специфических белков в режиме реального времени [31–33]. Более того, сочетание современных оптических методов с микрофлюидными технологиями дает возможность

получать количественные сведения о биологических процессах, происходящих в отдельных бактериальных клетках в условиях стресса [9, 10, 34].

Так, G. Manina с коллегами [34] для исследования взаимосвязи между скоростью роста *M. tuberculosis* и продукцией рибосом в отдельных клетках сконструировали репортерный штамм со встроенным в локус рибосомальной РНК геном, который кодирует дестабилизированный зеленый флуоресцентный белок. Используя покадровую микроскопию и микрофлюидное устройство, авторы изучили внутриклеточную динамику экспрессии рРНК *in vitro* и *in vivo*. Эти исследования подтвердили возможность формирования высокой гетерогенности бактерий в изогенной популяции под влиянием внешних раздражителей.

За годы использования эти методы успели завоевать популярность среди исследователей, однако необходимость использования зонда для визуализации ограничивает получаемый объем информации по сравнению с инновационными омиксными клеточными технологиями SCM [31, 33, 35–37].

Среди лазерных инструментов из арсенала технологий SCM, чаще всего используемых для оценки клеточных фенотипов в бактериальных популяциях, наибольшую популярность завоевали

проточная цитометрия (ПЦ) и рамановская спектрометрия (РС) комбинационного рассеяния [4, 9, 10, 25, 27, 36].

Принцип работы проточного цитометра основан на обнаружении двух типов свечения: рассеянного и флуоресцентного от одиночной клетки в суспензии. Рассеянное лазерное излучение предоставляет информацию об основных биологических характеристиках клеток (размере, форме, внутриклеточных свойствах, мембранном потенциале). Флуоресценция дает сведения о специфических физиологических свойствах клеточных фенотипов, окрашенных соответствующими комбинациями флуорохромных красителей (содержание ДНК, метаболическая активность, pH, жизнеспособность и др.) [9, 10, 38–40].

Многолетнее использование ПЦ для изучения гетерогенности в микробных популяциях выявило ряд существенных преимуществ метода: экономичность, точность, чувствительность, способность анализировать тысячи клеток за секунду [14, 20, 27]. Этот аналитический инструмент стал незаменимым для изучения фенотипирования небольших по численности клеточных субпопуляций — от оценки изменений функций и метаболической активности до идентификации генов, экспрессируемых в определенных условиях [20, 27, 38].

Несмотря на то что образцы исследуемых культур требуют предварительного посева и выделения, использование ПЦ позволяет получить результаты в реальном времени за относительно короткий срок [14, 38]. Это связано со скоростью оценки внутриклеточных молекулярно-биологических процессов в отдельных клетках в динамических условиях и с высоким разрешением, а также с получением большего разнообразия количественных данных [14, 27, 38].

Однако при использовании ПЦ для фенотипирования популяций были выявлены некоторые ограничения, связанные с неоднозначностью результатов, полученных на разных анализаторах, а также зависимость качества исследований от пробоподготовки [20, 38, 39].

Прогресс в изучении гетерогенности бактериальных популяций достигнут благодаря использованию нескольких технологий, основанных на различных биофизических принципах детекции. Спектр комбинационного рассеяния электромагнитных волн, получаемый при РС, с каждым годом привлекает все большее внимание специалистов различных профилей, в том числе молекулярных микробиологов [27, 36, 37, 40].

Эта высокоинформативная технология позволяет получить информацию о макромолекулярной структуре одиночной бактериальной клетки (белки, нуклеиновые кислоты, липиды и др.) в виде биохимического отпечатка [36, 40], а также оценить ак-

тивность метаболизма и степень жизнеспособности каждого гетерогенного фенотипа [27, 40].

В ходе недавнего исследования С. García-Timermans с бельгийскими коллегами [27] провели сравнительный анализ использования ПЦ и РС для изучения фенотипической гетерогенности в периодических бактериальных культурах *E. coli*. Авторы пришли к выводу, что ПЦ рационально использовать для количественной оценки фенотипической неоднородности на уровне популяции, а РС — для более глубокого анализа гетерогенности отдельных клеток, поскольку эта технология позволяет получить информацию о состоянии их функциональности в связи с макромолекулярной структурой.

Другой лазерный метод — инфракрасная Фурье-спектроскопия (FT-IR) — дает похожую информацию, но в его основе лежит поглощение энергии асимметричными функциональными группами внутриклеточных биомолекул [41] (таблица).

В последние годы при исследовании гетерогенности широкую популярность получили методы одноклеточной транскриптомики (субтранскриптомики), которые предоставляют количественную информацию о фенотипической экспрессии генов. Среди первых исследователей, которые экспериментально доказали связь генотипа с фенотипом на уровне одиночных клеток, были М.В. Elowitz с коллегами. Они показали полезность исследования уровней генных продуктов, РНК-мессенджеров для типирования отдельных клеток [47].

Например, благодаря применению аналитических инструментов из арсенала SCM М.В. Elowitz с коллегами [47] смогли провести важное экспериментальное исследование, в котором была количественно измерена стохастичность экспрессии генов на уровне отдельных клеток *E. coli* и отдельных молекул. В результате получены данные, позволяющие оценить многообразие стратегий, используемых на клеточном уровне для формирования гетерогенности в популяции.

Для проведения современных субтранскриптомных исследований используют технологию дифференциального анализа экспрессии генов, которая была иницирована созданием ДНК-микрочипов, или микрофлюидных устройств [48]. Это позволяет с помощью высокопроизводительных методов секвенирования РНК обнаружить около 85% транскриптома с разделением на три фракции: не зависящую от скорости роста, предназначенную для синтеза белка и для метаболических ферментов [20, 49, 50].

Последующие исследования [4, 9, 10] расширили возможность использования технологий SCM для количественной оценки молекулярных характеристик фенотипических вариаций в популяциях микроорганизмов. Например, в последние годы все большей популярностью для исследования фенотипической гетерогенности бактерий

Примеры использования современных технологий из арсенала SCM для фенотипирования бактериальных популяций
 Examples of using modern technologies from the Single Cell Microbiology (SCM) arsenal for phenotypic of bacterial populations

Технологии SCM SCM technologies	Принцип метода Method's principle	Получаемая информация Information obtained	Источник Source
Трансмиссионная электронная микроскопия Transmission electron microscopy	Получение изображения ультратонкого образца путём пропускания через него пучка электронов ($\lambda = 0,005$ нм) Image acquisition of an ultrathin sample by transmission of an electron beam through it ($\lambda = 0.005$ nm)	Визуализация субклеточных структур одиночных клеток бактерий и их связи с функцией фенотипов Visualization of subcellular structures of single bacterial cells and their relationship with the function of phenotypes	[42]
Атомно-силовая микроскопия Atomic force microscopy	Сканирующий зондовый микроскоп, основанный на ван-дер-ваальсовых взаимодействиях зонда с поверхностью образца Scanning probe microscope based on van der Waals interactions of the probe with the sample surface	Количественная оценка наномеханических свойств поверхности клеточной стенки, адгезии, морфологии, упругости (модуль Юнга) Quantitative assessment of nanomechanical properties of the cell wall surface, adhesion, morphology, elasticity (Young's modulus)	[16]
Флюоресцентная микроскопия Fluorescence microscopy	Визуализация изображения с использованием люминесценции возбуждённых атомов и молекул объектов Image visualization using luminescence of excited atoms and molecules of objects	Картирование микрогетерогенности pH, локальной концентрации ионов, электрического потенциала клетки Mapping of microheterogeneity of pH, local ion concentration, cell electrical potential	[17, 21]
Конфокальная флюоресцентная микроскопия Confocal fluorescence microscopy	Визуализация изображения биологических структур с использованием флуорофоров Imaging of biological structures using fluorophores	Трёхмерная флюоресцентная томография одиночных клеток бактерий 3D-fluorescence tomography of single bacterial cells	[21]
Поверхностный плазмонный резонанс Surface plasmon resonance	Возбуждение поверхностного плазмона на его резонансной частоте внешней электромагнитной волной Excitation of a surface plasmon at its resonant frequency by an external electromagnetic wave	Измерение кинетики связывания взаимодействий лигандов с отдельными клетками; статистический анализ гетерогенности в популяции Measurement of the kinetics of binding of ligand interactions with individual cells; statistical analysis of heterogeneity in a population	[43, 44]
Проточная цитометрия Flow cytometry	Обнаружение рассеянного света и флюоресценции от одиночной клетки Detection of scattered light and fluorescence from a single cell	Основные характеристики клеток и специфические физиологические свойства (pH, метаболизм и др.) The main characteristics of cells and specific physiological properties (pH, metabolism, etc.)	[9, 14, 20, 27, 38, 39]
РС комбинационного рассеяния Raman spectroscopy of Raman scattering	Способность молекул к неупругому (рамановскому) рассеянию монохроматического света The ability of molecules to inelastic (Raman) scattering of monochromatic light	Анализ макромолекулярного состава бактерий в виде биохимического отпечатка одиночной клетки Analysis of the macromolecular composition of bacteria in the form of a biochemical imprint of a single cell	[20, 27, 36, 37, 40]
Инфракрасная Фурье-спектроскопия Fourier transform infrared spectroscopy	Поглощение энергии асимметричными функциональными группами внутриклеточных биомолекул Energy absorption by asymmetric functional groups of intracellular biomolecules	Создание метаболических отпечатков бактерий до уровня подвида. Выявление тонких изменений в биохимических фенотипах бактерий Creating metabolic imprints of bacteria to the level of a subspecies. Identification of subtle changes in the biochemical phenotypes of bacteria	[41]
Флюоресцентное разведение Fluorescence dilution	Разбавление предварительно сформированного пула флюоресцентного белка после остановки его индукции Dilution of a preformed pool of fluorescent protein after stopping its induction	Изучение динамики внутриклеточной репликации бактерий на уровне отдельных клеток Studying the dynamics of intracellular bacterial replication at the level of individual cells	[19]
Магнитно-резонансная спектроскопия с высоким разрешением High-resolution magnetic resonance spectroscopy	Атомы ^1H обладают квантовым свойством вращения, генерируя радиочастотные сигналы. При использовании мощного магнитного поля возникают спектры высокого разрешения ^1H atoms have a quantum property of rotation, generating radio frequency signals. When using a powerful magnetic field, high-resolution spectra appear	Ассоциации между метаболитами и клеточными процессами в живых одиночных клетках бактерий. Дает количественную характеристику метаболического профиля клеток и их поверхностных структур при физиологическом состоянии и стрессе Associations between metabolites and cellular processes in living single bacterial cells. Gives a quantitative description of the metabolic profile of cells and their surface structures under physiological condition and stress	[45, 46]

пользуются спектроскопия поверхностного плазмонного резонанса (СПР) и ее разновидность — поверхностная плазмонно-резонансная микроскопия (ППРМ) [43, 44, 46].

Эти неинвазивные аналитические технологии не вызывают цитоллиз и позволяют проводить протеомный анализ на уровне отдельных клеток: сортировку и обнаружение отдельных белков [26, 48]. Кроме того, благодаря возможности визуализировать отдельные субклеточные объекты нано- и микрометрового масштаба и при этом сохранять исходное состояние целевого анализата, сегодня ППРМ стала универсальной сенсорной платформой для изучения кинетики биомолекулярного связывания [43, 44].

СПР — поверхностно-чувствительный метод без меток, который можно использовать для определения показателя преломления материала на тонкой металлической поверхности [43, 44, 46]. Он основан на колебании свободных электронов, индуцированной электромагнитной волной на границе раздела металл–диэлектрик. Эти электронные колебания генерируют поверхностные электромагнитные волны (так называемые плазмонные поляритоны), распространяющиеся и экспоненциально затухающие на границе раздела сред. СПР используют для исследования связывания олигонуклеотидов ДНК или белков по изменению угла минимальной отражательной способности [43, 46].

К. Syal с коллегами [43] продемонстрировали возможности метода плазмонной визуализации на примере исследования изогенной популяции *E. coli* O157:H7. Авторами была показана возможность получения в реальном времени кинетических констант связывания одиночных живых клеток бактерий со специфическими антителами IgG и количественного определения гетерогенности в микробной популяции.

Таким образом, современный спектр используемых аналитических технологий для мониторинга и оценки гетерогенности популяций бактерий достаточно многообразен и продолжает непрерывно совершенствоваться. Выбор методов зависит от поставленных целей и решаемых задач. Однако широкий выбор используемых аналитических инструментов для фенотипирования бактериальных популяций наводит на мысль о наличии методологической проблемы — отсутствия стандартизированного подхода при изучении этого важного биологического явления [4, 10].

В последние годы наблюдается увеличение количества исследований, направленных на изучение этапов формирования клеточных фенотипов в окружающей среде. Однако роль микробной гетерогенности в патогенезе и механизмах, лежащих в основе адаптации патогенов к среде организма-хозяина, пока редко рассматривается с использованием одноклеточных подходов в реальном времени.

Заключение

Фенотипическая гетерогенность в генетически идентичной популяции патогенных бактерий имеет решающее значение для адаптации микроорганизмов в период инфекционного процесса и развития их устойчивости к антибиотикам. Изучение и мониторинг формирования диверсификаций в изогенных популяциях патогенных бактерий, помимо фундаментальных знаний о механизмах, лежащих в основе этого биологического феномена, предоставляет значимую информацию об этой важной и недооцененной стратегии вирулентности [51–53].

Традиционные схемы лечения, основанные на широком использовании антибиотиков, оказываются все менее эффективными для лечения хронических и персистирующих инфекций. Изучение механизмов формирования клеточных фенотипов в популяциях конкретных видов и штаммов патогенных микроорганизмов имеет значение и для современной ориентации медицины на персонализированное лечение [54, 55].

Современные аналитические технологии, используемые для изучения динамики молекулярных трансформаций на уровнях как одиночных клеток, так и всей бактериальной популяции, становятся все более информативными и чувствительными. Например, в основе недавно разработанной технологии Persister-FACSeq лежит комбинированный метод флюоресцентной сортировки и секвенирования нового поколения. Это позволяет изучать механизм возникновения устойчивости к антибиотикам у некультивируемых клеток-персистеров в популяции *E. coli* путем изучения экспрессии генов и синтеза специфического белка [54].

Полученные за последние годы знания о фенотипической гетерогенности в бактериальных популяциях пока недостаточны для управления сообществами микроорганизмов. Возможно, более широкое применение омиксных технологий типирования расширит понимание молекулярно-биологических процессов на уровне отдельных клеток и даст возможность прогнозирования и контроля влияния устойчивых фенотипов патогенных бактерий на развитие инфекций, их вирулентность и резистентность к антимикробной терапии.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Oleskin A.V., Botvinko I.V., Tsavkelova E.A. Colonial organization and intercellular communication in microorganisms. *Microbiology (Mikrobiologiya)*. 2000; 69(3): 249–65. <https://doi.org/10.1007/BF02756730>
2. Магданова Л.А., Голясная Н.В. Гетерогенность как адаптивное свойство бактериальной популяции. *Микробиология*. 2013; 82(1): 3–13. <https://doi.org/10.7868/S0026365613010072>
3. Sánchez-Romero M.A., Casadesús J. Contribution of phenotypic heterogeneity to adaptive antibiotic resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014; 111(1): 355–60. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316084111>

4. Heyse J., Buyschaert B., Props R., Rubbens P., Skirtach A.G., Waegeman W., et al. Coculturing bacteria leads to reduced phenotypic heterogeneities. *Appl. Environ. Microbiol.* 2019; 85(8): e02814–18. <https://doi.org/10.1128/AEM.02814-18>
5. Jeanson S., Flourey J., Gagnaire V., Lortal S., Thierry A. Bacterial colonies in solid media and foods: a review on their growth and interactions with the micro-environment. *Front. Microbiol.* 2015; 6: 1284. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01284>
6. Ryall B., Eydallin G., Ferenci T. Culture history and population heterogeneity as determinants of bacterial adaptation: the adaptomics of a single environmental transition. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2012; 76(3): 597–25. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05028-11>
7. Dhar N., McKinney J.D. Microbial phenotypic heterogeneity and antibiotic tolerance. *Curr. Opin. Microbiol.* 2007; 10(1): 30–8. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2006.12.007>
8. Ackermann M. A functional perspective on phenotypic heterogeneity in microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015; 13(8): 497–08. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3491>
9. Davis K.M., Isberg R.R. Defining heterogeneity within bacterial populations via single cell approaches. *Bioessays.* 2016; 38(8): 782–90. <https://doi.org/10.1002/bies.201500121>
10. González-Cabaleiro R., Mitchell A.M., Smith W., Wipat A., Ofiteru I.D. Heterogeneity in pure microbial systems: experimental measurements and modeling. *Front. Microbiol.* 2017; 8: 1813. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01813>
11. Tsimring L.S. Noise in biology. *Reports. Prog. Phys.* 2014; 77(2): 26601. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw273>
12. Li G.W., Xie X.S. Central dogma at the single-molecule level in living cells. *Nature.* 2011; 475(7356): 308–15. <https://doi.org/10.1038/nature10315>
13. Govers S.K., Adam A., Blockeel H., Aertsen A. Rapid phenotypic individualization of bacterial sister cells. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08660-0>
14. Heins A.L., Johanson T., Han S., Lundin L., Carlquist M., Gerney K.V., et al. A quantitative flow cytometry to understand population heterogeneity in response to changes in substrate availability in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* chemostats. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2019; 7: 187. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00187>
15. Lewis K. Persister cells. *Annu. Rev. Microbiol.* 2010; 64: 357–72. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134306>
16. Dorobantu L.S., Bhattacharjee S., Foght J.M., Gray M.R. Atomic force microscopy measurement of heterogeneity in bacterial surface hydrophobicity. *Langmuir.* 2008; 24(9): 4944–51. <https://doi.org/10.1021/la7035295>
17. Cao H., Kuipers O.P. Influence of global gene regulatory networks on single cell heterogeneity of green fluorescent protein production in *Bacillus subtilis*. *Microb. Cell. Fact.* 2018; 17(1): 134. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0985-9>
18. Stracy M., Uphoff S., Garza de Leon F., Kapanidis A.N. In vivo single-molecule imaging of bacterial DNA replication, transcription, and repair. *FEBS Lett.* 2014; 588(19): 3585–94. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.05.026>
19. Helaine S., Cheverson A.M., Watson K.G., Faure L.M., Matthews S.A., Holden D.W. Internalization of *Salmonella* by macrophages induces formation of nonreplicating persisters. *Science.* 2014; 343(6167): 204–08. <https://doi.org/10.1126/science.1244705>
20. Ambriz-Avina V., Contreras-Garduno J.A., Pedraza-Reyes M. Applications of flow cytometry to characterize bacterial physiological responses. *Biomed. Res. Int.* 2014; 2014: 461941. <https://doi.org/10.1155/2014/461941>
21. Burdikova Z., Svindrych Z., Pala J., Hickey C.D., Wilkinson M.G., Panek J., et al. Measurement of pH micro-heterogeneity in natural cheese matrices by fluorescence lifetime imaging. *Front. Microbiol.* 2015; 6: 183. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00183>
22. Han Y., Zhang F. Heterogeneity coordinates bacterial multi-gene expression in single cells. *PLoS Comput. Biol.* 2020; 16(1): e1007643. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007643>
23. Casadesús J., Low D.A. Programmed heterogeneity: epigenetic mechanisms in bacteria. *J. Biol. Chem.* 2013; 288(20): 13929–35. <https://doi.org/10.1074/jbc.R113.472274>
24. Андрюков Б.Г., Сомова Л.М., Матосова Е.В., Ляпун И.Н. Фенотипическая пластичность бактерий как стратегия резистентности и объект современных антимикробных технологий (обзор). *Современные технологии в медицине.* 2019; 11(2): 164–82. <http://doi.org/10.17691/stm2019.11.2.22>
25. Brehm-Stecher B.F., Johnson E.A. Single-cell microbiology: tools, technologies, and applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2004; 68(3): 538–59. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.3.538-559.2004>
26. Fritzsche F.S., Dusny C., Frick O., Schmid A. Single-cell analysis in biotechnology, systems biology, and biocatalysis. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 2012; 3: 129–55. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-062011-081056>
27. García-Timmermans C., Rubbens P., Heyse J., Kerckhof F.M., Props R., Skirtach A.G., et al. Discriminating bacterial phenotypes at the population and single-cell level: a comparison of flow cytometry and raman spectroscopy fingerprinting. *Cytometry A.* 2020; 97(7): 713–26. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23952>
28. Ceuppens S., Boon N., Uyttendaele M. Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2013; 84(3): 433–50. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12110>
29. Stewart M.K., Cummings L.A., Johnson M.L., Berezow A.B., Cookson B.T. Regulation of phenotypic heterogeneity permits *Salmonella* evasion of the host caspase-1 inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011; 108(51): 20742–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108963108>
30. Heins A.L., Weuster-Botz D. Population heterogeneity in microbial bioprocesses: origin, analysis, mechanisms, and future perspectives. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 2018; 41(7): 889–16. <https://doi.org/10.1007/s00449-018-1922-3>
31. Xie X.S., Choi P.J., Li G.W., Lee N.K., Lia G. Single-molecule approach to molecular biology in living bacterial cells. *Annu. Rev. Biophys.* 2008; 37: 417–44. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.37.092607.174640>
32. Hinterdorfer P., Garcia-Parajo M.F., Dufrene Y.F. Single-molecule imaging of cell surfaces using near-field nanoscopy. *Acc. Chem. Res.* 2012; 45(3): 327–36. <https://doi.org/10.1021/ar2001167>
33. Skinner S.O., Sepúlveda L.A., Xu H., Golding I. Measuring mRNA copy number in individual *Escherichia coli* cells using single-molecule fluorescent *in situ* hybridization. *Nat. Protoc.* 2013; 8(6): 1100–13. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.066>
34. Manina G., Dhar N., McKinney J.D. Stress and host immunity amplify *Mycobacterium tuberculosis* phenotypic heterogeneity and induce nongrowing metabolically active forms. *Cell. Host. Microbe.* 2015; 17(1): 32–46. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.11.016>
35. Arbel-Goren R., Shapira Y., Stavans J. Method for labeling transcripts in individual *Escherichia coli* cells for single-molecule fluorescence *in situ* hybridization experiments. *J. Vis. Exp.* 2017; (130): 56600. <https://doi.org/10.3791/56600>
36. Read D.S., Woodcock D.J., Strachan N.J.C., Forbes K.J., Colles F.M., Maiden M.C.J., et al. Evidence for phenotypic plasticity among multihost *Campylobacter jejuni* and *C. coli* lineages, obtained using ribosomal multilocus sequence typing and Raman spectroscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013; 79(3): 965–73. <https://doi.org/10.1128/AEM.02521-12>
37. van de Vossen J., Tervahauta H., Maquelin K., Blokker-Koopmans C.H.W., Uytewaal-Aarts M., van der Kooij D., et al. Identification of bacteria in drinking water with Raman.

ОБЗОРЫ

- Anal. Methods*. 2013; 5(11): 2679–87.
<https://doi.org/10.1039/c3ay40289d>
38. Davey H.M. Prospects for the automation of analysis and interpretation of flow cytometric data. *Cytometry A*. 2010; 77(1): 3–5. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20835>
39. Davey H.M. Flow cytometric techniques for the detection of microorganisms. *Methods. Cell. Sci.* 2002; 24(1-3): 91–7. <https://doi.org/10.1023/A:1024106317540>
40. Андрюков Б.Г., Карпенко А.А., Матосова Е.В., Ляпун И.Н. Рамановская спектроскопия — современная диагностическая технология для изучения и индикации возбудителей инфекций (обзор). *Современные технологии в медицине*. 2019; 11(4): 161–74. <http://doi.org/10.17691/stm2019.11.4.19>
41. Wharfe E.S., Jarvis R.M., Winder C.L., Whiteley A.S., Goodacre R. Fourier transform infrared spectroscopy as a metabolite fingerprinting tool for monitoring the phenotypic changes in complex bacterial communities capable of degrading phenol. *Environ. Microbiol.* 2010; 12(12): 3253–63. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02300.x>
42. Shukla S., Bajpai V.K. Visual demonstration of transmission electron microscopy for intracellular observation of a single bacterial cell. *Bangladesh J. Pharmacol.* 2017; 12(1): 23–7. <https://doi.org/10.3329/bjp.v12i1.31390>
43. Syal K., Wang W., Shan X., Wang S., Chen H.Y., Tao N. Plasmonic imaging of protein interactions with single bacterial cells. *Biosens. Bioelectron.* 2015; 63: 131–7. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.06.069>
44. Peterson A.W., Halter M., Tona A., Plant A.L., Elliott J.T. Mass measurements of focal adhesions in single cells using high resolution surface plasmon resonance microscopy. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.* 2018; 10509: 1050905. <https://doi.org/10.1117/12.2290776>
45. Righi V., Constantinou C., Kesarwani M., Rahme L.G., Tzika A.A. Effects of a small, volatile bacterial molecule on *Pseudomonas aeruginosa* bacteria using whole cell high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy and genomics. *Int. J. Mol. Med.* 2018; 42(4): 2129–36. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3760>
46. Zhou X.L., Yang Y., Wang S., Liu X.W. Surface plasmon resonance microscopy: from single molecule sensing to single cell imaging. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2020; 59(5): 1776–85. <https://doi.org/10.1002/anie.201908806>
47. Elowitz M.B., Levine A.J., Siggia E.D., Swain P.S. Stochastic gene expression in a single cell. *Science*. 2002; 297(5584): 1183–6. <https://doi.org/10.1126/science.1070919>
48. Liu Y., Singh A.K. Microfluidic platforms for single cell protein analysis. *J. Lab. Autom.* 2013; 18(6): 446–54. <https://doi.org/10.1177/22110-68213-494389>
49. Cho S., Cho Y., Lee S., Kim J., Yum H., Kim S.C., et al. Current challenges in bacterial transcriptomics. *Genomics. Inform.* 2013; 11(2): 76–82. <https://doi.org/10.5808/GI.2013.11.2.76>
50. Shahrezaei V., Marguerat S. Connecting growth with gene expression: of noise and numbers. *Curr. Opin. Microbiol.* 2015; 25: 127–35. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.05.012>
51. Schröter L., Dersch P. Phenotypic diversification of microbial pathogens – cooperating and preparing for the future. *J. Mol. Biol.* 2019; 431(23): 4645–55. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.06.024>
52. Weigel W.A., Dersch P. Phenotypic heterogeneity: a bacterial virulence strategy. *Microbes Infect.* 2018; 20(9-10): 570–7. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2018.01.008>
53. Mortier J., Tadesse W., Govers S.K., Aertsen A. Stress-induced protein aggregates shape population heterogeneity in bacteria. *Curr. Genet.* 2019; 65(4): 865–9. <https://doi.org/10.1007/s00294-019-00947-1>
54. Henry T.C., Brynildsen M.P. Development of Persister-FACSeq: a method to massively parallelize quantification of persister physiology and its heterogeneity. *Sci. Rep.* 2016; 6: 25100. <https://doi.org/10.1038/srep25100>
55. Binder D., Drepper T., Jaeger K.E., Delvigne F., Wiechert W., Kohlheyer D., et al. Homogenizing bacterial cell factories: analysis and engineering of phenotypic heterogeneity. *Metab. Eng.* 2017; 42: 145–56. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.06.009>

REFERENCES

- Oleskin A.V., Botvinko I.V., Tsavkelova E.A. Colonial organization and intercellular communication in microorganisms. *Microbiology (Mikrobiologiya)*. 2000; 69(3): 249–65. <https://doi.org/10.1007/BF02756730>
- Magdanova L.A., Golyasnaya N.V. Heterogeneity as an adaptive trait of microbial populations. *Microbiology (Mikrobiologiya)*. 2013; 82(1): 1–10. <https://doi.org/10.1134/S0026261713010074>
- Sánchez-Romero M.A., Casadesús J. Contribution of phenotypic heterogeneity to adaptive antibiotic resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014; 111(1): 355–60. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316084111>
- Heyse J., Buyschaert B., Props R., Rubbens P., Skirtach A.G., Waegeman W., et al. Coculturing bacteria leads to reduced phenotypic heterogeneities. *Appl. Environ. Microbiol.* 2019; 85(8): e02814–18. <https://doi.org/10.1128/AEM.02814-18>
- Jeanson S., Flourey J., Gagnaire V., Lortal S., Thierry A. Bacterial colonies in solid media and foods: a review on their growth and interactions with the micro-environment. *Front. Microbiol.* 2015; 6: 1284. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01284>
- Ryall B., Eydallin G., Ferenci T. Culture history and population heterogeneity as determinants of bacterial adaptation: the adaptomics of a single environmental transition. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2012; 76(3): 597–25. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05028-11>
- Dhar N., McKinney J.D. Microbial phenotypic heterogeneity and antibiotic tolerance. *Curr. Opin. Microbiol.* 2007; 10(1): 30–8. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2006.12.007>
- Ackermann M. A functional perspective on phenotypic heterogeneity in microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015; 13(8): 497–08. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3491>
- Davis K.M., Isberg R.R. Defining heterogeneity within bacterial populations via single cell approaches. *Bioessays*. 2016; 38(8): 782–90. <https://doi.org/10.1002/bies.201500121>
- González-Cabaleiro R., Mitchell A.M., Smith W., Wipat A., Ofiteru I.D. Heterogeneity in pure microbial systems: experimental measurements and modeling. *Front. Microbiol.* 2017; 8: 1813. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01813>
- Tsimring L.S. Noise in biology. *Reports. Prog. Phys.* 2014; 77(2): 26601. <https://doi.org/10.1093/nar/gkwt273>
- Li G.W., Xie X.S. Central dogma at the single-molecule level in living cells. *Nature*. 2011; 475(7356): 308–15. <https://doi.org/10.1038/nature10315>
- Govers S.K., Adam A., Blockeel H., Aertsen A. Rapid phenotypic individualization of bacterial sister cells. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08660-0>
- Heins A.L., Johanson T., Han S., Lundin L., Carlquist M., Gerneay K.V., et al. A quantitative flow cytometry to understand population heterogeneity in response to changes in substrate availability in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* chemostats. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2019; 7: 187. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00187>
- Lewis K. Persister cells. *Annu. Rev. Microbiol.* 2010; 64: 357–72. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134306>
- Dorobantu L.S., Bhattacharjee S., Foght J.M., Gray M.R. Atomic force microscopy measurement of heterogeneity in bacterial surface hydrophobicity. *Langmuir*. 2008; 24(9): 4944–51. <https://doi.org/10.1021/la7035295>
- Cao H., Kuipers O.P. Influence of global gene regulatory networks on single cell heterogeneity of green fluorescent protein

- production in *Bacillus subtilis*. *Microb. Cell. Fact.* 2018; 17(1): 134. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0985-9>
18. Stracy M., Uphoff S., Garza de Leon F., Kapanidis A.N. In vivo single-molecule imaging of bacterial DNA replication, transcription, and repair. *FEBS Lett.* 2014; 588(19): 3585–94. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.05.026>
 19. Helaine S., Cheverton A.M., Watson K.G., Faure L.M., Matthews S.A., Holden D.W. Internalization of *Salmonella* by macrophages induces formation of nonreplicating persisters. *Science.* 2014; 343(6167): 204–08. <https://doi.org/10.1126/science.1244705>
 20. Ambriz-Avina V., Contreras-Garduno J.A., Pedraza-Reyes M. Applications of flow cytometry to characterize bacterial physiological responses. *Biomed. Res. Int.* 2014; 2014: 461941. <https://doi.org/10.1155/2014/461941>
 21. Burdikova Z., Svindrych Z., Pala J., Hickey C.D., Wilkinson M.G., Panek J., et al. Measurement of pH micro-heterogeneity in natural cheese matrices by fluorescence lifetime imaging. *Front. Microbiol.* 2015; 6: 183. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00183>
 22. Han Y., Zhang F. Heterogeneity coordinates bacterial multi-gene expression in single cells. *PLoS Comput. Biol.* 2020; 16(1): e1007643. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007643>
 23. Casadesús J., Low D.A. Programmed heterogeneity: epigenetic mechanisms in bacteria. *J. Biol. Chem.* 2013; 288(20): 13929–35. <https://doi.org/10.1074/jbc.R113.472274>
 24. Andryukov B.G., Somova L.M., Matosova E.V., Lyapun I.N. Phenotypic plasticity as a strategy of bacterial resistance and an object of advanced antimicrobial technologies (review). *Sovremennye tekhnologii v meditsine.* 2019; 11(2): 164–82. <http://doi.org/10.17691/stm2019.11.2.22> (in Russian)
 25. Brehm-Stecher B.F., Johnson E.A. Single-cell microbiology: tools, technologies, and applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2004; 68(3): 538–59. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.3.538-559.2004>
 26. Fritzsche F.S., Dusny C., Frick O., Schmid A. Single-cell analysis in biotechnology, systems biology, and biocatalysis. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 2012; 3: 129–55. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-062011-081056>
 27. García-Timmermans C., Rubbens P., Heyse J., Kerckhof F.M., Props R., Skirtach A.G., et al. Discriminating bacterial phenotypes at the population and single-cell level: a comparison of flow cytometry and raman spectroscopy fingerprinting. *Cytometry A.* 2020; 97(7): 713–26. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23952>
 28. Ceuppens S., Boon N., Uyttendaele M. Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2013; 84(3): 433–50. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12110>
 29. Stewart M.K., Cummings L.A., Johnson M.L., Berezow A.B., Cookson B.T. Regulation of phenotypic heterogeneity permits *Salmonella* evasion of the host caspase-1 inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011; 108(51): 20742–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108963108>
 30. Heins A.L., Weuster-Botz D. Population heterogeneity in microbial bioprocesses: origin, analysis, mechanisms, and future perspectives. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 2018; 41(7): 889–16. <https://doi.org/10.1007/s00449-018-1922-3>
 31. Xie X.S., Choi P.J., Li G.W., Lee N.K., Lia G. Single-molecule approach to molecular biology in living bacterial cells. *Annu. Rev. Biophys.* 2008; 37: 417–44. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.37.092607.174640>
 32. Hinterdorfer P., Garcia-Parajo M.F., Dufrene Y.F. Single-molecule imaging of cell surfaces using near-field nanoscopy. *Acc. Chem. Res.* 2012; 45(3): 327–36. <https://doi.org/10.1021/ar2001167>
 33. Skinner S.O., Sepúlveda L.A., Xu H., Golding I. Measuring mRNA copy number in individual *Escherichia coli* cells using single-molecule fluorescent in situ hybridization. *Nat. Protoc.* 2013; 8(6): 1100–13. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.066>
 34. Manina G., Dhar N., McKinney J.D. Stress and host immunity amplify *Mycobacterium tuberculosis* phenotypic heterogeneity and induce nongrowing metabolically active forms. *Cell. Host. Microbe.* 2015; 17(1): 32–46. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.11.016>
 35. Arbel-Goren R., Shapira Y., Stavans J. Method for labeling transcripts in individual *Escherichia coli* cells for single-molecule fluorescence *in situ* hybridization experiments. *J. Vis. Exp.* 2017; (130): 56600. <https://doi.org/10.3791/56600>
 36. Read D.S., Woodcock D.J., Strachan N.J.C., Forbes K.J., Colles F.M., Maiden M.C.J., et al. Evidence for phenotypic plasticity among multihost *Campylobacter jejuni* and *C. coli* lineages, obtained using ribosomal multilocus sequence typing and Raman spectroscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013; 79(3): 965–73. <https://doi.org/10.1128/AEM.02521-12>
 37. van de Vossen J., Tervahauta H., Maquelin K., Blokker-Koopmans C.H.W., Uytewaal-Aarts M., van der Kooij D., et al. Identification of bacteria in drinking water with Raman. *Anal. Methods.* 2013; 5(11): 2679–87. <https://doi.org/10.1039/c3ay40289d>
 38. Davey H.M. Prospects for the automation of analysis and interpretation of flow cytometric data. *Cytometry A.* 2010; 77(1): 3–5. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20835>
 39. Davey H.M. Flow cytometric techniques for the detection of microorganisms. *Methods. Cell. Sci.* 2002; 24(1-3): 91–7. <https://doi.org/10.1023/A:1024106317540>
 40. Andryukov B.G., Karpenko A.A., Matosova E.V., Lyapun I.N. Raman spectroscopy – modern diagnostic technology for study and indication of infectious agents (review). *Sovremennye tekhnologii v meditsine.* 2019; 11(4): 161–74. <http://doi.org/10.17691/stm2019.11.4.19> (in Russian)
 41. Wharfe E.S., Jarvis R.M., Winder C.L., Whiteley A.S., Goodacre R. Fourier transform infrared spectroscopy as a metabolite fingerprinting tool for monitoring the phenotypic changes in complex bacterial communities capable of degrading phenol. *Environ. Microbiol.* 2010; 12(12): 3253–63. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02300.x>
 42. Shukla S., Bajpai V.K. Visual demonstration of transmission electron microscopy for intracellular observation of a single bacterial cell. *Bangladesh J. Pharmacol.* 2017; 12(1): 23–7. <https://doi.org/10.3329/bjp.v12i1.131390>
 43. Syal K., Wang W., Shan X., Wang S., Chen H.Y., Tao N. Plasmonic imaging of protein interactions with single bacterial cells. *Biosens. Bioelectron.* 2015; 63: 131–7. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.06.069>
 44. Peterson A.W., Halter M., Tona A., Plant A.L., Elliott J.T. Mass measurements of focal adhesions in single cells using high resolution surface plasmon resonance microscopy. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.* 2018; 10509: 1050905. <https://doi.org/10.1117/12.2290776>
 45. Righi V., Constantinou C., Kesarwani M., Rahme L.G., Tzika A.A. Effects of a small, volatile bacterial molecule on *Pseudomonas aeruginosa* bacteria using whole cell high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy and genomics. *Int. J. Mol. Med.* 2018; 42(4): 2129–36. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3760>
 46. Zhou X.L., Yang Y., Wang S., Liu X.W. Surface plasmon resonance microscopy: from single molecule sensing to single cell imaging. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2020; 59(5): 1776–85. <https://doi.org/10.1002/anie.201908806>
 47. Elowitz M.B., Levine A.J., Siggia E.D., Swain P.S. Stochastic gene expression in a single cell. *Science.* 2002; 297(5584): 1183–6. <https://doi.org/10.1126/science.1070919>
 48. Liu Y., Singh A.K. Microfluidic platforms for single cell protein analysis. *J. Lab. Autom.* 2013; 18(6): 446–54. <https://doi.org/10.1177/22110-68213-494389>

ОБЗОРЫ

49. Cho S., Cho Y., Lee S., Kim J., Yum H., Kim S.C., et al. Current challenges in bacterial transcriptomics. *Genomics. Inform.* 2013; 11(2): 76–82. <https://doi.org/10.5808/GI.2013.11.2.76>
50. Shahrezaei V., Marguerat S. Connecting growth with gene expression: of noise and numbers. *Curr. Opin. Microbiol.* 2015; 25: 127–35. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.05.012>
51. Schröter L., Dersch P. Phenotypic diversification of microbial pathogens – cooperating and preparing for the future. *J. Mol. Biol.* 2019; 431(23): 4645–55. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.06.024>
52. Weigel W.A., Dersch P. Phenotypic heterogeneity: a bacterial virulence strategy. *Microbes Infect.* 2018; 20(9-10): 570–7. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2018.01.008>
53. Mortier J., Tadesse W., Govers S.K., Aertsen A. Stress-induced protein aggregates shape population heterogeneity in bacteria. *Curr. Genet.* 2019; 65(4): 865–9. <https://doi.org/10.1007/s00294-019-00947-1>
54. Henry T.C., Brynildsen M.P. Development of Persister-FACSeq: a method to massively parallelize quantification of persister physiology and its heterogeneity. *Sci. Rep.* 2016; 6: 25100. <https://doi.org/10.1038/srep25100>
55. Binder D., Drepper T., Jaeger K.E., Delvigne F., Wiechert W., Kohlheyer D., et al. Homogenizing bacterial cell factories: analysis and engineering of phenotypic heterogeneity. *Metab. Eng.* 2017; 42: 145–56. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.06.009>

Информация об авторах

Андрюков Борис Георгиевич[✉] — д.м.н., в.н.с. лаб. молекулярной микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия, andrukov_bg@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4456-808X>

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

Ляпун Ирина Николаевна — к.б.н., с.н.с. лаб. молекулярной микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5290-3864>

Бынина Марина Павловна — м.н.с. лаб. молекулярной микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8255-328X>

Матосова Екатерина Владимировна — м.н.с. лаб. молекулярной микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9968-3347>

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

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

Статья поступила в редакцию 30.04.2020;
принята к публикации 07.07.2020; опубликована 25.02.2021.

Information about the authors

Boris G. Andrukov[✉] — D. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of molecular microbiology, Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia, andrukov_bg@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4456-808X>

Nelly F. Timchenko — D. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of molecular microbiology, Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6051-292X>

Irina N. Lyapun — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of molecular microbiology, Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5290-3864>

Marina P. Bynina — junior researcher, Laboratory of molecular microbiology, Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8255-328X>

Ekaterina V. Matosova — junior researcher, Laboratory of molecular microbiology, Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9968-3347>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

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

The article was submitted 30.04.2020;
accepted for publication 07.07.2020; published 25.02.2021.

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-74>

Заболееваемость арбовирусными инфекциями на юге европейской части Российской Федерации

Василенко Н.Ф.^{1✉}, Прислегина Д.А.¹, Малецкая О.В.¹, Таран Т.В.¹,
Платонов А.Е.², Куличенко А.Н.¹

¹Ставропольский противочумный институт, Ставрополь, Россия;

²Центральный НИИ эпидемиологии, Москва, Россия

Аннотация

Цель — анализ заболеваемости арбовирусными инфекциями (АВИ) на юге европейской части Российской Федерации в 2015–2019 гг.

Материалы и методы. Анализ заболеваемости проводили, используя сведения из карт эпидемиологического обследования очага инфекционного заболевания (форма № 357/у), а также донесения по заболеваемости АВИ Управлений Роспотребнадзора, предоставленные Научно-методическому центру по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней II–IV групп патогенности для субъектов Северо-Кавказского и Южного федеральных округов. Полученные данные обработаны с использованием программы «MS Excel 2010».

Результаты. Показано, что на европейском юге России в современный период ежегодно регистрируются Крымская геморрагическая лихорадка (КГЛ), лихорадка Западного Нила (ЛЗН), клещевой вирусный энцефалит и лихорадка денге. Отмечено увеличение территории с зарегистрированными эпидемическими проявлениями КГЛ и ЛЗН, что свидетельствует о расширении ареала их возбудителей. Наблюдается удлинение продолжительности эпидемического сезона для КГЛ и ЛЗН, вовлечение в эпидемический процесс лиц всех возрастных групп, в том числе детей раннего возраста. Установлено значительное возрастание завозных случаев лихорадки денге. В ряде субъектов обнаружены маркеры возбудителей клещевого вирусного энцефалита, лихорадок Батаи, Инко, Синдбис, Тягиня. В Астраханской области выявлен высокий уровень гуморального иммунитета населения к вирусам Западного Нила, Батаи, Инко, Синдбис Тягиня, Укуниемы, Бханджа, Дхори.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о необходимости эпидемиологического надзора как за АВИ с выраженной эпидемиологической и клинической манифестацией, так и за инфекциями, удельный вес которых в структуре инфекционной патологии юга России достаточно не изучен, но которые несут потенциальный риск инфицирования.

Ключевые слова: Крымская геморрагическая лихорадка, лихорадка Западного Нила, клещевой вирусный энцефалит, лихорадка денге, заболеваемость, субъекты юга России

Финансирование. Часть исследования, посвящённая анализу заболеваемости КГЛ, ЛЗН и КВЭ, выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 19-75-20088), исполнители — А.Е. Платонов, Д.А. Прислегина.

Для цитирования: Василенко Н.Ф., Прислегина Д.А., Малецкая О.В., Таран Т.В., Платонов А.Е., Куличенко А.Н. Заболеваемость арбовирусными инфекциями на юге европейской части Российской Федерации. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021; 98(1): 84–90. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-74>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-74>

Arbovirus infections incidence in the south of the European part of the Russian Federation

Nadezhda F. Vasilenko^{1✉}, Daria A. Prislegina¹, Olga V. Maletskaya¹, Tatiana V. Taran¹,
Aleksandr E. Platonov², Aleksandr N. Kulichenko¹

¹Stavropol Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia

²Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Abstract

Purpose: analysis of the arbovirus infections incidence in the south of the European part of the Russian Federation in 2015–2019.

Materials and methods. Data from statistical documentation (epidemiological examination of the infectious disease cases, reports on the arbovirus infections incidence) reported by Departments of Rospotrebnadzor to Scientific and Methodological Center for monitoring pathogens of infectious and parasitic diseases of 1–3 risk groups for subjects of the North Caucasian and Southern Federal Districts were analyzed. The obtained data were processed using Microsoft Excel 2010 program.

Results. In the south of the European part of the Russian Federation Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF), West Nile fever (WNF), tick-borne viral encephalitis and dengue fever cases are registered annually. An expansion of the territory with registered epidemic manifestations of CCHF and WNF was noted, reflecting an increase in the area of circulation of their pathogens. An expansion of CCHF and WNF epidemic season with the involvement into the epidemic process of people from all age groups including young children was observed. Significant increase in number of imported cases of dengue fever was documented. Markers of tick-borne viral encephalitis, Batai, Inko, Sindbis, and Tyaginya fevers were detected in residents of a number of territories. A high levels of population humoral immunity to West Nile, Batai, Inko, Sindbis Tyaginya, Ukuniemi, Bhanja, Dkhori viruses were identified in the Astrakhan region.

Conclusion. The data obtained indicate the need for epidemiological surveillance both for arbovirus infections with a pronounced epidemiological and clinical manifestations, and for infections, the proportion of which in the structure of infectious pathology in southern Russia has not been sufficiently studied, but carrying a potential risk of spreading.

Keywords: Crimean-Congo hemorrhagic fever, West Nile fever, tick-borne viral encephalitis, dengue fever, morbidity, subjects of the south of the Russian Federation

Funding. Part of the study devoted to the analysis of the incidence of CHF, WNF and tick-borne viral encephalitis was carried out at the expense of a grant from the Russian Science Foundation (project No. 19-75-20088), performers — A.E. Platonov, D.A. Prisleгина.

For citation: Vasilenko N.F., Prisleгина D.A., Maletskaya O.V., Taran T.V., Platonov A.E., Kulichenko A.N. Arbovirus infections incidence in the south of the European part of the Russian Federation. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(1):84–90. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-74>

Введение

Возбудителями арбовирусных природно-очаговых инфекций (АВИ) являются арбовирусы — экологическая группа вирусов, передаваемых восприимчивым позвоночным животным кровососущими членистоногими. Термин «arbovirus» (вирус, передаваемый членистоногими, — «arthropod-borne») был введён в 1963 г. Международным подкомитетом по номенклатуре вирусов [1]. Переносчиками арбовирусов могут быть комары, клещи, москиты, мокрецы и мошки, которые осуществляют передачу возбудителей трансмиссивным путём. АВИ распространены повсеместно, отличаются антигенным разнообразием патогенов, массовостью эпидемических вспышек, а также нередко отсутствием специфических средств лечения и профилактики.

Европейская часть юга Российской Федерации — Южный (ЮФО) и Северо-Кавказский (СКФО) федеральные округа — характеризуется ландшафтным разнообразием территорий, где расположены полупустынные, степные, лесостепные, предгорные и горные регионы. Климатические условия способствуют благоприятному обитанию широкого спектра мышевидных грызунов и диких птиц, в том числе перелётных, являющихся резервуаром арбовирусов в природных биотопах, а также кровососущих членистоногих переносчиков. Мониторинг трансмиссивных природно-очаговых инфекционных АВИ является важнейшей составляющей обеспечения санитарно-эпидемио-

логического благополучия населения юга европейской части России в связи с наличием природных очагов Крымской геморрагической лихорадки (КГЛ), лихорадки Западного Нила (ЛЗН), лихорадки Синдбис, Батаи, Тягиня, возбудители которых относятся ко II группе патогенности (опасности) [2–6]. В Международных медико-санитарных правилах ВОЗ (2005) вспышки, эпидемии и даже единичные случаи ЛЗН рассматриваются как чрезвычайные ситуации международного масштаба.

Эпидемические проявления АВИ могут быть спорадическими или охватывать в короткие сроки значительный контингент населения в виде крупных вспышек и эпидемий. Антропогенное преобразование биосферы приводит к изменениям экологической ситуации в регионе, что негативно влияет на функционирование паразитарных систем природных очагов арбовирусов [2]. Сезонные миграции птиц способствуют трансконтинентальному переносу возбудителей. Всё это определяет необходимость проведения систематического мониторинга эпидемических проявлений АВИ на европейской части юга России.

Цель работы — анализ заболеваемости АВИ на юге европейской части Российской Федерации в современный период (2015–2019 гг.).

Материалы и методы

Основным методом являлся эпидемиологический анализ, включающий сбор эпидемиологиче-

ских данных; описательный и аналитический этапы. Анализ заболеваемости проводили, используя сведения из карт эпидемиологического обследования очага инфекционного заболевания (форма № 357/у), а также донесения по заболеваемости АВИ Управлений Роспотребнадзора, предоставленные Научно-методическому центру по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней II–IV групп патогенности для субъектов СКФО и ЮФО. Полученные данные обрабатывали с использованием программы «Microsoft Office Excel 2010».

Результаты

КГЛ — особо опасная трансмиссивная природно-очаговая АВИ, эндемичная для европейской части юга России, характеризуется тяжёлым течением болезни с геморрагическим синдромом и высоким уровнем летальности (3–20%). Возбудителем КГЛ является вирус Крымской-Конго геморрагической лихорадки (вирус ККГЛ) рода *Orthonairovirus* семейства *Nairoviridae* порядка *Bunyavirales* [7].

Природный очаг КГЛ активизировался в 1999 г., когда первые проявления инфекции были отмечены в Обливском районе Ростовской области [8]. В период с 1999 по 2019 г. в России зарегистрирован 2331 случай КГЛ, из них 93 (4%) — с летальным исходом. За последние 5 лет эпидемические проявления КГЛ отмечались в 9 субъектах РФ: Ставропольском крае, Республике Дагестан, Карачаево-Черкесской и Кабардино-Балкарской Республиках, Ростовской, Волгоградской, Астраханской областях, в Республиках Калмыкия и Крым. Выявлено 586 случаев заболевания КГЛ, из них 18 (3,1%) летальных. В 2015 г. зарегистрирован один завозной случай КГЛ из Республики Крым в Воронежскую область. Максимальное число больных выявлено в Ростовской области — 249 (8 летальных). В Ставропольском крае зарегистрировано 175 (2 летальных) случаев заболевания, в Республике Калмыкия — 78 (4 летальных). Единичные случаи КГЛ ежегодно отмечают в Республике Дагестан. В 2015 г. 1 больной зарегистрирован в Карачаево-Черкесской Республике, а в 2016 г. впервые выявлен случай заболевания в Кабардино-Балкарской Республике (с летальным исходом). В Республике Крым было диагностировано 2 случая КГЛ: в 2015 г. — у жителя Воронежской области и в 2017 г. — у местного жителя. Максимальное количество (162) больных КГЛ зарегистрировано в 2016 г. В 2017–2018 гг. уровень заболеваемости снизился, а в 2019 г. возрос в 1,86 раза — выявлено 134 случая, что на 86,1% больше, чем в 2018 г., и в 1,14 раза выше среднемноголетних значений (в 2015–2019 гг. — в среднем 117,2 случая в год). Уровень летальности КГЛ в 2019 г. составил 4,5%.

Наряду с сохранением характерной для КГЛ весенне-летней сезонности (апрель–август) с пиком

в мае–июне с 2016 г. единичные случаи заболевания были отмечены в сентябре в Ставропольском крае, Республике Калмыкия и Волгоградской области. В 2018 г. случай КГЛ впервые был выявлен в ноябре в Ростовской области.

Заболеваемость регистрировалась во всех возрастных группах. В Астраханской области большинство заболевших относились к возрастной группе 60–69 лет, в остальных территориальных субъектах наибольшее число больных (66,9%) было выявлено среди лиц в возрасте 30–59 лет. Доля детей составила 2,7%, в том числе до 14 лет — 1,5%. Случаи заболевания КГЛ среди детей были зарегистрированы в Ростовской области и Ставропольском крае.

В большинстве случаев инфицирование людей происходило при реализации инокуляционного или контаминационного путей передачи вируса ККГЛ при уходе за крупным и мелким рогатым скотом (68,4%) или выполнении полевых работ (8,9%). Преобладающее число больных КГЛ составили официально неработающие лица (60,3%), являющиеся владельцами домашнего скота в личных подсобных хозяйствах. На долю работников сельского хозяйства пришлось всего 22,3% инфицированных.

В Ставропольском крае в 2016 г. выявлен нозокомиальный случай заражения вирусом ККГЛ медицинской сестры в результате биологической аварии (укол кисти руки иглой от катетера после проведения внутривенной инъекции больной КГЛ). В этом же году в Республике Калмыкия зарегистрирован случай заражения беременной женщины (срок гестации 34–35 нед.) с летальным исходом у её новорождённого ребенка, у которого была выявлена РНК вируса ККГЛ.

Тяжёлое течение болезни отмечалось у 20% больных, у остальных — среднетяжёлое. По сравнению с предыдущими годами в 2017 г. выявлен рост геморрагических форм КГЛ на 10%. Диагноз КГЛ подтверждён у всех больных методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и иммуноферментным анализом (ИФА).

ЛЗН — особо опасная трансмиссивная природно-очаговая АВИ, вызываемая вирусом Западного Нила рода *Flavivirus* семейства *Flaviviridae* [9]. Болезнь у людей может протекать в нейроинфекционной, экзантематозной и гриппоподобной формах с летальностью 2–14%.

Обострение эпидемиологической ситуации на юге европейской части России произошло в 1999 г., когда в Волгоградской и Астраханской областях была зарегистрирована крупная вспышка ЛЗН (475 больных) с высокой летальностью (10%) [10]. За последние 5 лет эпидемические проявления болезни отмечены в 8 субъектах юга России: Волгоградской, Астраханской, Ростовской областях, Краснодарском и Ставропольском краях, Республиках Дагестан и Крым, в Севастополе. Выявлено 445 случаев заболевания ЛЗН,

из них 7 (1,6%) летальных. Наибольшее количество случаев отмечено в Астраханской области — 130 (3 летальных), Ростовской области — 126 (4 летальных) и Краснодарском крае — 125 случаев. Максимальное количество больных ЛЗН (320) зарегистрировано в 2019 г., что в 4,6 раза больше, чем в 2018 г., и в 5 раз выше среднемноголетних значений (в 2015–2019 гг. — в среднем 89 случаев в год). Уровень летальности от ЛЗН в 2019 г. составил 1,3%. Случаи ЛЗН за последние 5 лет на юге России регистрировались с июня по декабрь с пиком заболеваемости в августе–сентябре (405 человек, 91%). Однако в разные годы единичные больные регистрировались в октябре ($n = 10$), ноябре ($n = 2$) и декабре ($n = 1$). В анализируемый период на юге России ЛЗН заболело в 1,3 раза больше городских жителей, чем сельских; мужчины болели чаще женщин в 1,4 раза. Случаи заболевания отмечались во всех возрастных группах. Наибольшее число больных было зарегистрировано среди лиц 60–69 (22,7%) и 50–59 лет (18,6%). В структуре общей заболеваемости дети до 14 лет составили 3,6% (16 человек), из них до 3 лет — 3 ребёнка, от 4 до 6 лет — 4. Случаи ЛЗН среди детей были зарегистрированы в Астраханской и Ростовской областях, Ставропольском и Краснодарском краях.

В результате эпидемиологического анализа установлено, что группами риска являются лица, которые в летний сезон работают или отдыхают в природных биотопах и подвергаются нападению комаров [5]. Практически все (96%) инфицированные вирусом Западного Нила на юге России в анамнезе отмечали укусы комарами.

У больных преобладали клинические формы средней тяжести без поражения центральной нервной системы (83,4%). У 4,5% больных диагностирована лёгкая клиническая форма инфекции, у 11,0% — тяжёлая, у 1,1% — бессимптомная. Все случаи ЛЗН были подтверждены лабораторно: 75,3% — методом ИФА, 8,3% — ПЦР, 16,4% — ИФА и ПЦР.

Завозные случаи ЛЗН отмечены в Ростовской области (2017, 2019 гг.), Ставропольском крае (2018, 2019 гг.), Республике Дагестан (2018 г.), Астраханской области и Краснодарском крае (2019 г.).

Клещевой вирусный энцефалит (КВЭ) — природно-очаговая АВИ, вызываемая вирусом клещевого энцефалита рода *Flavivirus* семейства *Flaviviridae* и переносимая иксодовыми клещами. Заболевание отличается тяжестью клинических проявлений, высокой частотой остаточных явлений в виде параличей, а также летальностью, достигающей 30% [1].

В 2015–2019 гг. на европейском юге России зарегистрировано 11 случаев заболевания КВЭ, из них 9 — в Республике Крым, эндемичной по этой инфекции [11]. При этом 5 случаев были завозны-

ми: в 2018 г. по 1 случаю из Свердловской области и Республики Татарстан, в 2019 г. — из Красноярского края, Тверской и Кемеровской областей. Местные случаи заражения отмечены в 2015 г. (2 случая в Белогорском районе, 1 — в Ялте) и в 2017 г. (1 случай в Кировском районе). В 2017 г. выявлены 2 завозных случая в Краснодарском крае (из Алтайского края и Челябинской области). Больные регистрировались в июне–августе с пиком в июле (54,5%). Наибольшее число больных (72,7%) было зарегистрировано среди лиц в возрасте 30–59 лет. У детей до 14 лет случаи КВЭ не отмечены. Все заболевшие указывали на присасывание клеща. В среднетяжёлой форме болезнь протекала у 10 человек. В тяжёлой форме отмечено течение инфекции у 1 больного в Симферополе, закончившееся летальным исходом. Все случаи КВЭ подтверждены лабораторно (ПЦР или ИФА).

Лихорадка денге — природно-очаговая АВИ, вызываемая вирусом денге рода *Flavivirus* семейства *Flaviviridae*. Заболевание носит эпидемический характер, широко распространено в Юго-Восточной Азии, на Тихоокеанских островах, в странах Карибского бассейна, в Южной и Центральной Америке. Основные переносчики — синантропные комары *Aedes aegypti*. Определённое значение в качестве переносчика имеет другой синантропный вид комаров — *Ae. albopictus* [1].

На юге России ежегодно отмечаются завозные случаи лихорадки денге. За последние 5 лет зарегистрировано 27 больных лихорадкой денге: 12 (44,4%) — в Волгоградской области, 9 (33,3%) — в Краснодарском крае, 3 (11,1%) — в Ростовской области, 2 (7,4%) — в Ставропольском крае и 1 (3,7%) больной — в Республике Крым. Заражение 16 (59,3%) человек произошло во время отдыха в Таиланде, 3 — в Индонезии, по 2 — в Индии и на Кубе, по 1 — во Вьетнаме, Малайзии и Республике Чад. В 2019 г. зарегистрировано 11 больных, что в 2,2 раза больше, чем в 2018 г., и в 5,5 раза больше, чем в 2015 г. Все заболевшие в анамнезе также указывали на укусы комарами.

Больные регистрировались на протяжении всего года. Случаи заболевания отмечались только среди взрослого трудоспособного населения в возрасте 20–59 лет, причём почти половина больных (48,1%) выявлена в возрастной группе 20–29 лет. Городские жители составили 89%; болели лица обоего пола: 14 мужчин и 13 женщин. В 96,3% случаев болезнь протекала в среднетяжёлой форме. У всех больных диагноз был подтверждён лабораторно (методом ПЦР — 25 больным, ИФА — 2).

Обсуждение

Результаты эпидемиологического мониторинга АВИ показали, что в последние 5 лет на юге европейской части России ежегодно регистрируются КГЛ, ЛЗН, КВЭ и лихорадка денге.

КГЛ в России регистрируется только на юге европейской части страны, где полупустынно-степной природный очаг КГЛ занимает обширную территорию. Граница его проходит в пределах северных районов Ростовской области, южных районов Волгоградской области, северо-восточных районов Астраханской области. На востоке очаг КГЛ ограничивается Каспийским морем, на юге граница очага не выходит за пределы Республик Дагестан и Ингушетия, Ставропольского края, а также предгорных районов Кабардино-Балкарской и Карачаево-Черкесской Республик. На юго-западе граница очага проходит в пределах центральных районов Краснодарского края, а на западе охватывает Республику Крым [12]. Полученные нами данные показали, что наряду со значительным возрастанием заболеваемости КГЛ в 2019 г. продолжилось расширение территории с зарегистрированными эпидемическими проявлениями инфекции. Так, впервые выявлены случаи КГЛ в Константиновском районе Ростовской области, Сергокалинском и Шамильском районах Республики Дагестан [13].

В результате молекулярно-генетических исследований изолятов вируса ККГЛ установлено, что в природном очаге на юге России циркулирует данный возбудитель, относящийся к 3 генотипам:

- «Европа-1», включающий 4 субтипа:
 - Va — «Ставрополь–Ростов–Астрахань-1»,
 - Vb — «Волгоград–Ростов–Ставрополь»,
 - Vc — «Астрахань-2»,
 - Vd — «Крым»;
- «Африка-3»;
- впервые описанный генотип «Калмыкия».

Преобладающим генотипом является «Европа-1», характерный для юга европейской части страны; изолят вируса ККГЛ генотипа «Африка-3» впервые выявлен на территории России в 2013 г. в Ставропольском крае, что свидетельствует о возможности заноса новых генетических вариантов вируса из других регионов мира [14].

ЛЗН регистрируется главным образом на юге европейской части страны. Так, за последние 5 лет в России заболели 616 человек, из них 445 (72,2%) — на юге, в том числе в ЮФО — 438 (71,1%), в СКФО — 7 (1,1%). Если до 2019 г. эпидемическое неблагополучие по ЛЗН стабильно сохранялось только в 3 субъектах ЮФО — преимущественно в Волгоградской, Астраханской и Ростовской областях [5], то в 2019 г. 37,5% больных зарегистрированы в Краснодарском крае, где раньше отмечались спорадические случаи заболевания. Кроме того, в Ставропольском крае из 4 случаев ЛЗН два имели местное происхождение. Ранее местное заражение вирусом Западного Нила с летальным исходом отмечалось в 2012 г. Эти данные наряду с выявлением маркеров вируса Западного Нила в данных регионах свидетельствуют о расширении ареала возбу-

дителя ЛЗН. Результаты молекулярно-генетического исследования этого патогена свидетельствуют, что на территории юга европейской части России циркулирует вирус Западного Нила 2-го генотипа [15].

Местные случаи заражения КВЭ на европейском юге России зарегистрированы только в Республике Крым. Следует отметить, что при проведении эпизоотологического мониторинга маркеры КВЭ (РНК и антиген) выявлены в Ставропольском и Краснодарском краях (у иксодовых клещей), в Ростовской (у иксодовых клещей, мышевидных грызунов, птиц), Волгоградской и Астраханской (у иксодовых клещей) областях, в Республиках Адыгея и Дагестан (у иксодовых клещей), что свидетельствует о наличии носителей и переносчиков возбудителя инфекции в данных регионах [16].

Лихорадка денге для России — завозная инфекционная болезнь. Однако в районе Большого Сочи обнаружены местные популяции комаров *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus* — основных переносчиков вируса денге. После длительного отсутствия комаров *Ae. aegypti* их популяция восстановилась на территории Черноморского побережья, что не исключает возможности возникновения вспышек лихорадки денге в этом регионе [17]. В последние годы страны Юго-Восточной Азии пользуются особой популярностью у российских туристов, в связи с чем в России с 2012 г. стали регистрировать завозные случаи лихорадки денге [18]. Эпидемиологический мониторинг лихорадки денге свидетельствует о возрастании количества завозных случаев этой инфекции как в России в целом, так и на юге страны. По сравнению с 2015 г. количество больных лихорадкой денге в России в 2019 г. увеличилось в 3 раза, а на юге европейской части страны — в 5,5 раза. В связи с этим в отношении лихорадки денге должна быть настороженность у медицинских работников первичного звена — всем пациентам с лихорадкой неясной этиологии, прибывающим из стран, эндемичных по лихорадке денге, с наличием синдрома поражения желудочно-кишечного тракта и экзантемы необходимо провести обследование на наличие маркеров вируса денге серологическими и молекулярно-биологическими методами. Всех больных с подозрением на лихорадку денге необходимо госпитализировать в инфекционный стационар [19].

Заключение

Установлено, что в современный период на юге европейской части России регистрируются АВИ: Крымская геморрагическая лихорадка, лихорадка Западного Нила, КВЭ и лихорадка денге. Отмечено расширение территории с зарегистрированными эпидемическими проявлениями КГЛ и ЛЗН, что свидетельствует об увеличении ареала их возбудителей. Установлено значительное возрастание за-

возных случаев лихорадки денге на юг европейской части страны. Случаев заболеваний, вызванных вирусами Батаи, Инко, Синдбис и Тягиня, в субъектах юга России не зарегистрировано, однако маркёры перечисленных инфекционных агентов выявлены в биоценозах Ростовской и Астраханской областей. В Ставропольском крае обнаружены маркеры вирусов Батаи, Инко, Тягиня, в сыворотках крови овец — антитела к вирусу Батаи. На территории Астраханской области выявлен высокий уровень гуморального иммунитета населения к вирусам Западного Нила, Батаи, Инко, Синдбис, Тягиня, Укуниемы, Бханджа и Дхори. Данные наших исследований свидетельствуют о необходимости проведения эпидемиологического надзора как за АВИ с выраженной эпидемиологической и клинической манифестацией, так и за теми, удельный вес которых в структуре инфекционной патологии юга России достаточно не изучен, но возможен потенциальный риск инфицирования ими.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Львов Д.К., ред. *Руководство по вирусологии: Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: МИА; 2013.
2. Пичурина Н.Л., Москвитина Э.А. Арбовирусные инфекции в Ростовской области. *Национальные приоритеты России. Специальный выпуск*. 2011; (2): 85–6.
3. Галимзянов Х.М., Василькова В.В., Кантемирова Б.И., Акмаева Л.Р. Арбовирусные комариные инфекции. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2016; (4): 9–36.
4. Василенко Н.Ф., Малецкая О.В., Таран Т.В., Прислегина Д.А., Манин Е.А., Семенко О.В. и др. Анализ заболеваемости природно-очаговыми инфекциями на юге европейской части России в 2017 году. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019; 96(2): 44–50. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-2-44-50>
5. Малецкая О.В., Прислегина Д.А., Таран Т.В., Платонов А.Е., Дубянский В.М., Волюнкина А.С. и др. Природно-очаговые вирусные лихорадки на юге Европейской части России. Лихорадка Западного Нила. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; (1): 109–14. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-1-109-114>
6. Варфоломеева Н.Г., Ермаков А.В., Василенко Н.Ф., Шкарлет Г.П., Малецкая О.В., Кирейцева О.А. и др. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым вирусным инфекциям на территории Ставропольского края. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2011; (2): 16–8.
7. ICTV. Virus Taxonomy; 2016. Available at: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/
8. Онищенко Г.Г., Айдинов Т.Г., Москвитина Э.А., Ломов Ю.М., Тихонов Н.Г., Прометной В.И. и др. Крымская-Конго геморрагическая лихорадка в Ростовской области: эпидемиологические особенности вспышки. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2000; 77(2): 36–42.
9. Fauquet С.М., Mayo М.А., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A., eds. *Virus taxonomy: VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Hong Kong: Academic Press; 2005 981–98.
10. Львов Д.К., Савченко С.Т., Алексеев В.В., Липницкий А.В., Пашанина Т.П. Эпидемиологическая ситуация и прогноз заболеваемости лихорадкой Западного Нила на территории Российской Федерации. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2008; (1): 10–2. [https://doi.org/10.21055/0370-1069-2008-1\(95\)-10-12](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2008-1(95)-10-12)

11. Письмо Роспотребнадзора № 01/1205-2018-32 «О перечне эндемичных территорий по клещевому вирусному энцефалиту в 2017 г.». М.; 2018. URL: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/71803714>
12. Василенко Н.Ф., Манин Е.А., Малецкая О.В., Волюнкина А.С., Прислегина Д.А., Семенко О.В. и др. Современное состояние природного очага Крымской геморрагической лихорадки в Российской Федерации. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019; 96(4): 46–52. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-4-46-52>
13. Волюнкина А.С., Котенев Е.С., Малецкая О.В., Скударева О.Н., Шапошникова Л.И., Колосов А.В. и др. Эпидемиологическая ситуация по Крымской геморрагической лихорадке в Российской Федерации в 2019 г. и прогноз на 2020 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; (1): 14–20. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-1-14-20>
14. Волюнкина А.С., Куличенко А.Н. Современные методы молекулярно-генетического анализа Крымской геморрагической лихорадки в системе эпидемиологического надзора. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2016; (1): 53–60.
15. Путинцева Е.В., Алексейчик И.О., Чеснокова С.Н., Удовиченко С.К., Бородай Н.В., Никитин Д.Н. и др. Результаты мониторинга возбудителя лихорадки Западного Нила в Российской Федерации в 2019 г. и прогноз развития эпидемической ситуации на 2020 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; (1): 51–60. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-1-51-60>
16. Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Прислегина Д.А., Василенко Н.Ф., Таран Т.В., Дубянский В.М. и др. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекционным болезням в Южном и Северо-Кавказском федеральных округах в 2015–2019 гг. (*Аналитические обзоры*). Ставрополь; 2016–2020.
17. Ганушкина Л.А., Дремова В.П. Комары *Aedes aegypti* и *Aedes albopictus* skuse – новая биологическая угроза для юга России. *Медицинская паразитология*. 2012; (3): 49–55.
18. Ларичев В.Ф., Сайфуллин М.А., Акиншина Ю.А., Хуторецкая Н.В., Бутенко А.М. Завозные случаи арбовирусных инфекций в Российской Федерации. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2012; (1): 35–38.
19. Еремушкина Я.М., Кускова Т.К., Вдовина Е.Т., Раздобарина С.Е., Савина А.В., Богданова М.В. Клинический анализ завозных случаев лихорадки денге, выявленных в Москве и Московской области. *Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение*. 2018; 7(4): 102–10. <https://doi.org/10.24411/2305-3496-2018-14016>

REFERENCES

1. L'vov D.K., ed. *Guide to Virology: Viruses and Viral Infections of Humans and Animals [Rukovodstvo po virusologii: Virusy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh]*. Moscow: MIA; 2013. (in Russ.)
2. Pichurina N.L., Moskvitina E.A. Arbovirus infections in the Rostov region. *Natsional'nye prioriteti Rossii. Spetsial'nyy vypusk*. 2011; (2): 85–6. (in Russ.)
3. Galimzyanov Kh.M., Vasil'kova V.V., Kantemirova B.I., Akmaeva L.R. Arbovirus mosquito infections. *Infektsionnye bolezni: Novosti. Mneniya. Obuchenie*. 2016; (4): 9–36. (in Russ.)
4. Vasilenko N.F., Maletskaya O.V., Taran T.V., Prislegina D.A., Manin E.A., Semenko O.V., et al. Analysis of natural focal infections incidence in the south of the European part of the Russian Federation in 2017. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2019; 96(2): 44–50. (in Russ.) <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-2-44-50>
5. Maletskaya O.V., Prislegina D.A., Taran T.V., Platonov A.E., Dubyanskiy V.M., Volynkina A.S., et al. Natural Focal Viral Fevers in the South of European Part of Russia. West Nile Fe-

- ver. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2020; (1): 109–14. (in Russ.) <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-1-109-114>
6. Varfolomeeva N.G., Ermakov A.V., Vasilenko N.F., Shkarlet G.P., Maletskaya O.V., Kireyitseva O.A., et al. Epidemiological situation on natural focal viral infections in the territory of the Stavropol region. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2011; (2): 16–8. (in Russ.)
 7. ICTV. Virus Taxonomy; 2016. Available at: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/
 8. Onishchenko G.G., Aydinov T.G., Moskvitina E.A., Lomov Yu.M., Tikhonov N.G., Prometnoy V.I., et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever in the Rostov region: epidemiological features of the outbreak. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2000; 77(2): 36–42. (in Russ.)
 9. Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A., eds. *Virus taxonomy: VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Hong Kong: Academic Press; 2005 981–98.
 10. L'vov D.K., Savchenko S.T., Alekseev V.V., Lipnitskiy A.V., Pashanina T.P. Epidemiological situation and prognostication of the West Nile fever morbidity in the territory of the Russian Federation. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2008; (1): 10–2. (in Russ.) [https://doi.org/10.21055/0370-1069-2008-1\(95\)-10-12](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2008-1(95)-10-12)
 11. Letter of Rospotrebnadzor № 01/1205-2018-32 «On the list of endemic territories for tick-borne viral encephalitis in 2017». Moscow; 2018. (in Russ.) Available at: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/71803714/>
 12. Vasilenko N.F., Manin E.A., Maletskaya O.V., Volynkina A.S., Prisleгина D.A., Semenko O.V., et al. The modern condition of Crimean-Congo haemorrhagic fever natural focus in the Russian Federation. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2019; 96(4): 46–52. (in Russ.) <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-4-46-52>
 13. Volynkina A.S., Kotenev E.S., Maletskaya O.V., Skudareva O.N., Shaposhnikova L.I., Kolosov A.V., et al. Epidemiological situation on Crimean-Congo hemorrhagic fever in the Russian Federation in 2019 and forecast for 2020. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2020; (1): 14–20. (in Russ.) <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-1-14-20>
 14. Volynkina A.S., Kulichenko A.N. Modern methods of molecular genetic analysis in the surveillance of the Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie*. 2016; (1): 53–60. (in Russ.)
 15. Putintseva E.V., Alekseychik I.O., Chesnokova S.N., Udovichenko S.K., Boroday N.V., Nikitin D.N., et al. Results of the West Nile fever agent monitoring in the Russian Federation in 2019 and the forecast of epidemic situation development in 2020. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2020; (1): 51–60. (in Russ.) <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-1-51-60>
 16. Kulichenko A.N., Maletskaya O.V., Prisleгина D.A., Vasilenko N.F., Taran T.V., Dubyanskiy V.M., et al. *Epidemiological situation on natural focal infectious diseases in the South and North Caucasian Federal Districts in 2018 (Analytical reviews) [Epidemiologicheskaya obstanovka po prirodno-ochagovym infektsionnym boleznyam v Yuzhnom i Severo-Kavkazskom federal'nykh okrugakh v 2015–2019 gg. (Analiticheskie obzory)]*. Stavropol'; 2016–2020. (in Russ.)
 17. Ganushkina L.A., Dremova V.P. Mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* skuse — a new biological threat to southern Russia *Meditinskaya parazitologiya*. 2012; (3): 49–55. (in Russ.)
 18. Larichev V.F., Sayfullin M.A., Akinshina Yu.A., Khutoretskaya N.V., Butenko A.M. Imported cases of arbovirus infections in the Russian Federation. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 2012; (1): 35–38. (in Russ.)
 19. Eremushkina Ya.M., Kuskova T.K., Vdovina E.T., Razdobarina S.E., Savina A.V., Bogdanova M.V. The main aspects of the clinical course of imported cases of dengue fever in Moscow and Moscow Region. *Infektsionnye bolezni: Novosti. Mneniya. Obuchenie*. 2018; 7(4): 102–110. (in Russ.) <https://doi.org/10.24411/2305-3496-2018-14016>

Информация об авторах

Василенко Надежда Филипповна — д.б.н., проф., г.н.с. лаб. эпидемиологии Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, nfvasilenko@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0001-7054-1302>

Прислегина Дарья Александровна — к.м.н., н.с. лаб. эпидемиологии Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9522-129X>

Малецкая Ольга Викторовна — д.м.н., проф., зам. директора по научной и противозидемической работе Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3003-4952>

Таран Татьяна Викторовна — д.м.н., зав. лаб. подготовки специалистов Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8070-0706>

Платонов Александр Евгеньевич — д.б.н., проф., г.н.с. лаб. эпидемиологии природно-очаговых инфекций ЦНИИ эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7450-0081>

Куличенко Александр Николаевич — д.м.н., проф., член-корр. РАН, директор Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9362-3949>

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

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

Статья поступила в редакцию 04.08.2020; принята к публикации 26.11.2020; опубликована 25.02.2021.

Information about the authors

Nadezhda F. Vasilenko — D. Sci. (Biol.), Prof., main researcher, Laboratory of epidemiology, Stavropol Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia, nfvasilenko@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0001-7054-1302>

Daria A. Prisleгина — PhD (Med.), researcher, Laboratory of epidemiology, Stavropol Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9522-129X>

Olga V. Maletskaya — D. Sci. (Med.), Deputy Director for scientific and anti-epidemic work, Stavropol Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3003-4952>

Tatiana V. Taran — D. Sci. (Med.), Head, Department of training of specialists, Stavropol Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8070-0706>

Alexander E. Platonov — D. Sci. (Biol.), Prof., main researcher, Laboratory of zoonoses, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7450-0081>

Aleksandr N. Kulichenko — D. Sci. (Med.), Prof., Associate Member of RAS, Director, Stavropol Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9362-3949>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

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

The article was submitted 04.08.2020; accepted for publication 26.11.2020; published 25.02.2021.



Современные представления об этиопатогенетических и генетических особенностях токсинов *Clostridium perfringens*

Лобзин Ю.В., Кветная А.С.[✉], Скрипченко Н.В., Железова Л.И.

Детский научно-клинический центр инфекционных болезней, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация

В обзоре представлены современные сведения о генетике и этиопатогенетических особенностях токсинов и ферментов *Clostridium perfringens*, в том числе о роли энтеротоксина *Clostridium perfringens* в развитии пищевого отравления и ряда кишечных заболеваний людей, животных и птиц.

Ключевые слова: *Clostridium perfringens*, энтеротоксин, порообразующие токсины, плотные контакты, клаудины, геном, хромосомы, плазмиды, обзор

Для цитирования: Лобзин Ю.В., Кветная А.С., Скрипченко Н.В., Железова Л.И. Современные представления об этиопатогенетических и генетических особенностях токсинов *Clostridium perfringens*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2021;98(1): 91–103.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-37>

Current notions about etiopathogenic and genetics specific features of *Clostridium perfringens* toxins

Yury V. Lobzin, Asya S. Kvetnaya[✉], Natalya V. Skripchenko, Lyudmila I. Zhelezova

Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Saint Petersburg, Russia

Abstract

The review presents modern data on the genetics and etiopathogenic features of *Clostridium perfringens* toxins, including the role of *Clostridium perfringens* enterotoxin, in the development of food poisoning and a number of intestinal diseases in humans, animals and birds.

Keywords: review, *Clostridium perfringens*, enterotoxin, pore-forming toxins, close contacts, claudin, genome, chromosomes, plasmids, review

For citation: Lobzin Yu.V., Kvetnaya A.S., Skripchenko N.V., Zhelezova L.I. Current notions about etiopathogenic and genetics specific features of *Clostridium perfringens* toxins. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(1):91–103.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-37>

Введение

Clostridium perfringens (CP), ранее известный как *Bacillus aerogenes capsulatus*, *Bacillus perfringens*, *Bacillus welchii* или *Clostridium welchii*, является грамположительной, спорообразующей, анаэробной палочковидной бактерией [1]. Впервые CP был выделен и идентифицирован как новый микроорганизм в 1891 г. Уильямом Уэлчем по результатам исследования проб секционного материала после вскрытия 38-летнего мужчины, погибшего от болезни, как было позже установлено, клинически схожей с «газовой гангреной». Использование

технологии молекулярного секвенирования для идентификации штамма CP, выделенного из проб мумифицированного желудка человека, жившего еще в V в. до н.э., свидетельствовало об его этиологической значимости [1]. Первое сообщение о связи заболеваний, ассоциированных с CP и пищевыми продуктами, появилось в начале XX в. Более убедительные доказательства этиологической роли CP в развитии заболеваний пищевого происхождения появились в 1940-х гг. в Англии и США. Классические исследования, проведенные Хоббсом и его коллегами в 1950-х гг., подтвердили этиологическую роль

CP в развитии пищевого отравления [2]. К 1969 г. была окончательно доказана этиологическая роль энтеротоксина *CP* в развитии пищевого отравления [3, 4]. Позже было установлено, что штаммы *CP*, продуцирующие токсины, встречаются повсеместно в окружающей среде: в почве, продуктах питания, сточных водах и кишечнике условно здоровых людей, птиц и животных. Они относятся к числу микроорганизмов, наиболее распространенных в мире, а также к числу актуальных патогенов человека, птиц и животных, являясь причиной развития гистотоксических инфекций, включая газовую гангрену (клостридиальный мионекроз) и заболевания, возникающие в кишечнике (пищевая токсикоинфекция, диарея, ассоциированная с антибиотиками, спорадическая диарея, энтерит, некротический энтерит и энтеротоксемия) [1–10]. Открыты новые факторы патогенности, расширены представления об эпидемиологии, биологии *CP*, токсинах и других факторах патогенности и их клинической значимости. Создана соответствующая техника культивирования токсинпродуцирующих штаммов *CP*, сформулированы современные представления об их этиопатогенетических и генетических особенностях [4].

В обзоре представлены этиопатогенетические и геномные особенности актуального патогена — *CP*, опубликованные за последние годы, в том числе современные характеристики факторов патогенности *CP* — токсинов, ферментов и др., а также их роль в развитии заболеваний. Особое внимание уделено обсуждению современного понимания особенностей биологии, генетики и механизмов действия токсинов *CP* и актуальных проблем, связанных с энтеротоксином *CP* [1, 3, 4].

Характеристика токсинов *C. perfringens*

CP относится к анаэробам рода *Clostridium*. Это грамположительные, крупные (0,8–1,5 × 4–8 мкм), полиморфные, неподвижные палочки, способные к токсино- и спорообразованию. Вирулентность *CP* в значительной степени опосредуется большим арсеналом факторов патогенности: токсинами, ферментами и другими факторами (таблица). *CP* использует более 20 белковых токсинов в развитии гистотоксических, неврологических, кишечных и энтеротоксемий у людей, животных и птиц [1, 8]. В соответствии с современной классификацией штаммы *CP* делятся на типы и токсины в зависимости от их способности продуцировать токсины: альфа- (*CPA*), бета- (*CPB*), эпсилон- (*ETX*), йота- (*ITX*), энтеротоксин (*CPE*) и некротические токсины, подобные типу В (*NetB* и *NetF*) [1, 8].

Хромосомно-кодированные токсины *CP* типа А (*CPA*) и перфринголизин О (*PFO*) — возбудители гистотоксической инфекции людей и животных, ведущие патогенетические факторы в развитии

газовой гангрены. Структурные гены, кодирующие эти токсины, — *cpa* (или *plc*) и *pfoA* — расположены на хромосоме. Продукция обоих токсинов регулируется системой *Agr*-подобного кворум-сенсинга, а также двухкомпонентной регуляторной системой *VirS/VirR* [11–13].

CPA — это металлофосфолипаза С цинка, обладающая фосфолипазной С и сфингомиелиназной активностью [11, 12, 14, 15]. *CPA* отщепляет фосфорилхолиновые головные группы от внешней поверхности бислойных фосфолипидных клеток хозяина, нарушая функцию мембран клеток хозяина, что приводит к лизису клеток и некрозу тканей. Анализ структуры *CPA* показывает, что он имеет два биологически активных домена: N-концевой α -спиральный домен, который включает один активный сайт фермента, и С-концевой β -сандвич-домен, осуществляющий токсическое действие на мембрану клеток хозяина [14, 15], структурное сходство которого с С2-липидсвязывающими доменами эукариотических белков — синаптотагмином и панкреатической липазой — определяет его токсические и иммунопротективные действия [11, 12, 14, 15]. Вместе с тем прямое разрушение мембраны клетки хозяина не является единственным механизмом, посредством которого *CPA* вызывает лизис клеток. Установлено, что *CPA* активирует путь внеклеточной сигнально-регулируемой киназы и тем самым индуцирует окислительный стресс в поражённых клетках и выработку интерлейкина-8, стимулируя действие киназы и митоген-активируемой протеинкиназы [15].

PFO может продуцироваться всеми типами *CP*, однако ген *pfoA* отсутствует у многих, если не у всех штаммов пищевого отравления *CPA*, несущих ген хромосомного энтеротоксина, и у штаммов *CP* типа С, ассоциированных с Darmbrand [13]. *PFO* является членом семейства порообразующих токсинов холестеринзависимого цитолизина, который также включает в себя листериолизин О и стрептолизин О. Холестеринзависимый цитолизин проду-

Классификация основных токсинов *CP*
Classification of the main *Clostridium perfringens* toxins

Тип Type	Токсины / Toxins					
	α (<i>CPA</i>)	β (<i>CPB</i>)	ϵ (<i>ETX</i>)	i (<i>ITX</i>)	<i>CPE</i>	<i>NetB</i>
A	+	–	–	–	–	–
B	+	+	+	–	–	–
C	+	+	–	–	+/-	–
D	+	–	+	–	+/-	–
E	+	–	–	+	+/-	–
F	+	–	–	–	+	–
I	+	–	–	–	–	+

цируется в виде растворимых мономеров, которые олигомеризуются на поверхности клетки-мишени с образованием порового комплекса, который затем претерпевает конформационные изменения и встраивается в мембрану, образуя большие поры [13].

Бета-токсин CP (CPB) — порообразующий токсин, имеет сходство с аминокислотной последовательностью порообразующих токсинов *Staphylococcus aureus* у 20–28% штаммов [16]. Этот токсин исключительно чувствителен к трипсину [17]. *In vivo* CPB вызывает некротический энтерит у овец, крупного рогатого скота и лошадей [18, 19]. Длительное воздействие бета-токсина на слизистую кишечника у этих животных приводит к абсорбции токсина в кровяное русло и развитию летальной энтеротоксемии.

Бета2-токсин CP (CPB2), несмотря на свое название, имеет в 15% случаев идентичную аминокислотную последовательность с CPB. CPB2 вызывает некротический энтерит у цыплят, энтерит у свиней, энтероколит у лошадей. Интерес представляют опубликованные результаты экспериментов на морских свинках, свидетельствующие о проявлении цитотоксичности только при высоких уровнях токсина (20 мкг/мл), при которых CPB2 вызывает геморрагический некроз в кишечнике морской свинки. Эта низкая активность CPB2 может отражать его нестабильность, возможно, из-за чувствительности к протеазам [20].

Эпсилон-токсин CP (ETX) считается наиболее мощным клостридиальным порообразующим токсином после ботулинического и столбнячного токсинов [21, 22] и является причиной развития некротического энтерита и энтеротоксемии у овец, крупного рогатого скота и лошадей [23–25]. Токсин секретируется в виде протоксина из 296 аминокислот, который затем протеолитически активируется пищеварительными протеазами, такими как химотрипсин и трипсин, или *in vitro* с помощью лямбда-токсина CP [23, 24].

Оптимальная активация протоксина достигается с помощью комбинации трипсина и химотрипсина, которая удаляет 13 аминокислот с N-конца и 29 аминокислот с C-конца. Удаление C-концевых аминокислот является критическим для продуцирования активного ETX из-за блокирования олигомеризации токсина оставшимися остатками аминокислот.

В связи с тем, что ETX, как и CPE, принадлежит к семейству аэролизинных порообразующих токсинов, структура белка ETX состоит из трех структурных доменов [25]:

- N-концевого домена, который, как полагают, важен для связывания рецептора;
- среднего домена, содержащего петлю β-шпильки; он обеспечивает токсину формирование пор;

- C-концевого домена, который предположительно участвует в процессе олигомеризации токсина.

Олигомеризация ETX первоначально происходит на поверхности мембраны. Получившаяся препора ETX затем быстро внедряется в мембрану с образованием активной поры с диаметром 0,4–1,0 нм и небольшой селективностью по анионам. Формирование пор в обработанных ETX клетках хозяина приводит к быстрой потере внутриклеточного K⁺ и повышению цитоплазматических уровней Ca²⁺ и Na⁺. ETX-индуцированная потеря цитоплазматического K⁺ запускает быструю гибель клеток из-за процесса некроза, включающего истощение АТФ.

Йота-токсин CP (ITX) является членом семейства клостридиальных бинарных токсинов и состоит из отдельных белков IA и IB, которые продуцируются в виде пропротеинов и затем протеолитически активируются после удаления N-концевых последовательностей от IA- и IB-белков под действием химотрипсина хозяина [26–28]. Вызывает энтеротоксемию у овец, коз и крупного рогатого скота, энтерит у кроликов, ягнят и крупного рогатого скота. Действие ITX начинается с связывания IB-белка токсина с его рецептором — липопротеином мембраны клеток хозяина, который служит рецептором также для некоторых других клостридиальных бинарных токсинов, включая *C. difficile*. Многофункциональный поверхностный белок CD44 клеток слизистой кишечника млекопитающих может также функционировать в качестве рецептора ITX [28].

Идентифицирован β-порообразующий токсин **NetB CP**, контролируемый геном *netb*, который вызывает некротический энтерит у кур [29–33]. NetB тесно связан с типом CPB и альфа-гемолизинном *St. aureus* [29]. Как и большинство этих токсинов, он продуцируется в виде мономера и, по-видимому, олигомеризуется на поверхности восприимчивых клеток кишечника кур, образуя поры размером 1,6–1,8 нм. Процесс порообразования активируется в результате взаимодействия молекулы токсина NetB с холестерином, усиливая образование пор [33].

Токсин TpeL CP, кодируемый геном *tpeL*, продуцируется некоторыми штаммами CP типов A, B и C [34–37]. Ген *tpeL* токсина CP экспрессируется во время споруляции под контролем сигма-факторов — Sro0A и SigE. Токсин TpeL CP является самым крупным известным CP-токсином, хотя некоторые штаммы продуцируют усеченный (~15 кД), менее активный вариант TpeL. TpeL принадлежит к семейству клостридиальных гликозилирующих токсинов (CGT), который идентичен токсинам типов A и B *C. difficile*, а также смертельным и геморрагическим токсинам *C. sordellii* и *C. novyi* альфа-токсинам. Как и другие CGT, TpeL обладает N-концевым доменом, опосредующим гликозилтрансферазную

активность, доменом с автокаталитической активностью и предполагаемым трансмембранным доменом, который, вероятно, доставляет ферментативный домен в цитоплазму клеток хозяина. Тем не менее TreL отличается от других токсинов своим сильно укороченным С-терминальным доменом, что позволяет ему связываться с дополнительными рецепторами клеток хозяина, обеспечивая для него расширение зоны действия. Таким образом, TreL связывается с неидентифицированными рецепторами и затем подвергается эндоцитозу [36, 37]. После расщепления инозит-гексакисфосфатзависимой цистеинпротеазы и транспорта через мембрану эндодитарного пузырька домен поступает в цитоплазму клеток хозяина. Благодаря своей уникальной способности связываться с сахарами, TreL является единственным токсином, который может использовать как UDP-глюкозу, так и преимущественно UDP-N-ацетилглюкозамин в качестве донорского субстрата, при этом экспрессируя вирулентность штаммов птичьего некротического энтерита.

CP производит плазмидно-кодируемый дельта-токсин и несколько хромосомно-кодируемых токсинов и ферментов — лямбда-, каппа-, мю-токсины, коллагеназу, гиалуронидазу, кластрипаин, цистеиновую протеазу, сиалидазу [1, 29, 38, 39]. Лямбда-токсин и термолитинподобная протеаза (36 кДа) могут активировать ETX и компонент IA или IB ITX *in vitro* [23, 24]. CP продуцирует несколько типов хромосомно-кодируемых ферментов сиалидаз, из них сиалидаза NanI весьма значима [1, 23, 24] в адгезии молекулы токсина с клеткой хозяина на начальном этапе развития гангрены, а также при заболеваниях, ассоциированных с токсинпродуцирующими штаммами CP типов В или D, опосредуя адгезию к энтероцитоподобным клеткам Saco-2 [1].

Энтеротоксин CP типа А (СРЕ) — самый распространенный токсин среди токсинотипов CP. СРЕ — порообразующий токсин, контролируемый хромосомным и плазмидным генами (*spe*), ответственный за развитие различных желудочно-кишечных заболеваний, связанных с пищевыми и непивцевыми факторами. Ген *spe* находится в хромосоме у большинства штаммов CPA, вызывающих пищевые отравления. Следовательно, продукция и действия СРЕ контролируются в основном геном *spe*, расположенным в хромосоме [1, 3, 4].

Структура СРЕ расшифрована. Установлено, что его первичная аминокислотная последовательность является высококонсервативной, за исключением некоторых штаммов CP типа E, которые продуцируют переменный и уникальный СРЕ [1, 3, 4, 8]. С помощью рентгеновской кристаллографии CP отнесен к семейству аэролизиннов — малых (35 кДа) порообразующих токсинов. СРЕ содержит 2 домена: С-концевой домен, который связывается с рецепторами клаудина — мембранного белка клеток

хозяина, и N-концевой домен — основной домен, предназначенный для образования пор.

Патогенетическое действие СРЕ начинается со связывания токсина с его рецепторами — белками семейства клаудиновых белков цитоплазматической мембраны клеток слизистой оболочки тонкого кишечника. Связывание молекул токсина СРЕ с клаудинами приводит к образованию «малых комплексов» (около 90 кДа), содержащих СРЕ, рецепторные и нереперторные клаудины. «Малый комплекс» сам по себе не оказывает цитотоксического действия на клетку хозяина, его роль значима в активации олигомеризации СРЕ в процессе создания на поверхности цитоплазматической мембраны клеток слизистой тонкого кишечника «большого комплекса» — СН-1. Это так называемая «пре-пора» энтеротоксина, или бета-шпилька (450 кДа), содержащая энтеротоксин и рецепторные и нереперторные клаудины, оказывающие цитотоксическое действие на цитоплазматическую мембрану. Цитотоксическое действие бета-шпильки на цитоплазматическую мембрану приводит к образованию катионно-селективной поры на цитоплазматической мембране, которая изначально проницаема для молекул менее 200 кДа. Образование пор СРЕ способствует массивному поступлению Ca^{2+} через цитоплазматическую мембрану в клетки слизистой кишечника, вызывая тем самым их гибель, зависящую от кальмодулина и кальпаина, посредством апоптоза, опосредованного каспазой 3 (при низких дозах СРЕ), или онкоза (при высоких дозах СРЕ). Поступление Ca^{2+} в клетку вызывает морфологическое повреждение, при котором обнажается поверхность базолатеральных клеток, позволяя, в свою очередь, СРЕ взаимодействовать с белками клаудинами и белком плотных соединений, называемым «окклюдином». Этот процесс приводит к образованию второго крупного (~550 кДа) комплекса СН-2, содержащего 6 копий СРЕ), окклюдин рецепторные и нереперторные клаудины. Таким образом, в тонком кишечнике, преимущественно в подвздошной кишке, энтеротоксин индуцирует деструктивный процесс на слизистой, характеризующийся десквамацией эпителия, атрофией и некрозом ворсинок [1, 3, 4]. СРЕ продуцируют штаммы типа А, С, D, E и NetF [1, 3, 4].

Роль токсинов *C. perfringens* в развитии заболеваний человека, птиц и животных

Пищевое отравление, вызванное CP типа А, считается вторым по уровню регистрации (до 1 млн случаев в год) бактериальным пищевым заболеванием в США [40–42]. Развитие пищевого отравления связывают с употреблением продуктов из мяса или птицы, контаминированных штаммами CP типа А, несущими, как правило, хромосомный ген *spe* (СРЕ) [1, 3, 4, 38, 43, 44]. Специфическая связь

хромосомных изолятов, продуцирующих СРЕ, с пищевым отравлением обусловлена исключительным свойством хромосомных штаммов *CP* формировать резистентные фенотипы микроорганизма, обеспечивающие устойчивость их спор за счет способности хромосомных штаммов СРЕ продуцировать уникальный вариант небольшого кислоторастворимого белка 4 (*Ssp-4*). При попадании в желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) пищи, контаминированной хромосомными штаммами *CP*, продуцирующими энтеротоксин, вегетативные формы, благодаря способности белка *Ssp-4* растворять кислоту, выживают, размножаются и затем быстро споруют, продуцируя энтеротоксин. К другим факторам, способствующим формированию резистентного фенотипа с устойчивостью спор, создаваемых большинством энтеротоксинпродуцирующих штаммов *CP* типа А, контролируемых плазмидным геном *spe*, относятся уменьшенный размер ядра споры, свидетельствующий о высокой степени обезвоживания молекулы энтеротоксина. Фактор *Spo0A* и альтернативные сигма-факторы *SigF*, *SigG*, *SigK* и *SigL* контролируют как споруляцию *in vivo*, так и продукцию энтеротоксина [44]. Энтеротоксин накапливается в «материнской» клетке до завершения споруляции, после чего материнская клетка лизируется, и свободный токсин проявляет свою основную функцию — развитие пищевого отравления.

В течение многих лет считалось, что СРЕ не воздействует на толстую кишку, несмотря на возможность этого органа связывать большое количество энтеротоксина из-за присутствия клаудинов рецепторов [1, 45–47]. Однако недавно доказано, что СРЕ вызывает повреждение тканей и потерю электролитов жидкости в толстом кишечнике кролика [46]. Эти результаты явились основой расследования причин развития некротизирующего колита у пациентов психиатрической клиники, наблюдаемого при вспышках тяжелых пищевых отравлений, вызванных *CP* типа А [47], и изучения условий и факторов, которые, скорее всего, отсрочили диарею и пролонгировали взаимодействие СРЕ с кишечником, способствуя абсорбции токсина и его циркуляции в организме [4, 47].

Многочисленными исследованиями установлено, что мясо и мясные продукты, контаминированные штаммами СРЕ, являются основными факторами передачи пищевого отравления [1, 3, 4]. Однако последние достижения в изучении генетики СРЕ и эпидемиологии пищевых отравлений представили новую информацию о дополнительных факторах передачи энтеротоксинпродуцирующих штаммов в развитии пищевых отравлений [1]. Обнаружение СРЕ в продуктах розничной торговли, фекалиях здорового человека и сточных водах определяет «новый» взгляд на эпидемиологию заболеваний, связанных с энтеротоксинпродуцирующими

CP типа А. Японские исследователи привели убедительные доказательства, что человек может играть роль переносчика и резервуара штаммов *CP* типа А, продуцирующих энтеротоксин [1, 48, 49].

Энтеротоксигенные штаммы могут стать причиной заболеваний, ассоциированных с *CP* типа А и не связанных с пищевым фактором передачи, — это антибиотикоассоциированная (ААД) и спорадическая диареи [50–52]. ААД обычно развивается у 5–10% пациентов после приема антибиотиков широкого спектра действия [50]. Спорадическая диарея чаще поражает пожилых людей старше 60 лет и редко лиц молодого возраста [51]. Клинически ААД и спорадическая диареи характеризуются болями в животе, большой продолжительностью (от 3 дней до нескольких недель) и гемоколитом. У пациентов, страдающих выраженной и длительной диареей, особенно у больных ААД, нередко развиваются обезвоживание и колит. Вместе с тем прогноз осложненного течения ААД и спорадической диареи благоприятный. Штаммы типа F также ответственны за развитие спорадической диареи, хотя в меньшей степени. ААД-ассоциированные штаммы *CP* более адгезивны по отношению к клеткам кишечного эпителия *Caco-2* по сравнению со штаммами, вызывающими пищевые отравления, что связано с продукцией сиалидазы *NanI* [1].

После Второй мировой войны штаммы *CP* вызвали вспышки некротического энтерита (называемые *Darmbrand*) у истощенных людей в Северной Германии [1, 3, 4, 53]. Установлено, что штаммы *Darmbrand* контролируются как плазмидными генами *spb*, так и хромосомными генами *spe*. Штаммы *Darmbrand* в основном генетически были связаны со штаммами пищевого отравления, вызванного СРЕ. Особо следует отметить, что штаммы *Darmbrand* продуцируют тот же вариант небольшого кислоторастворимого белка *Ssp-4*, но отличающийся более выраженной резистентностью по отношению к кислоте [43, 44]. Выявленный феномен, как предполагают, связан с клональной изменчивостью хромосомного гена *spe*.

В 1960–1970-х гг. в Папуа — Новой Гвинее был очень распространен пищевой некротический энтерит, обусловленный *CP* типа С (известный как *PigBel*), что привело к более чем 50% смертей среди детей в возрасте 5–10 лет [54]. Заболевание клинически характеризуется болью в животе, которая развивается через 1–5 дней после приема пищи с высоким содержанием белка.

Патогенез заболевания связан с низкобелковой диетой, которая приводит к ограниченному производству протеаз поджелудочной железы. Кроме того, основным продуктом питания в высокогорьях Папуа — Новой Гвинее является сладкий картофель, который содержит ингибитор трипсина. Поэтому, когда ребенок ест еду, содержащую сладкий

картофель и мясо, загрязненное *CP* типа С, в сочетании с диетическим фоном белкового недоедания, в кишечнике наблюдается небольшая активность трипсина, что приводит к деградации токсина. Изоляты РФО попадают в ЖКТ при употреблении загрязненного мяса (обычно свинины).

Актуален некротический энтерит, обусловленный *CP* типа А. Развитие этого заболевания связано с переключением птиц на высокобелковую диету, которая способствует быстрому росту *CP* в ЖКТ, или инфицированием *Eimeria* spp., которое, предположительно, облегчает инвазию токсина энтероцитов.

У штаммов *CP* при физическом контакте может происходить конъюгативный обмен токсинными плазмидами, что иногда может сопровождаться потерей одной токсинной плазмиды в реципиентном штамме из-за несовместимости плазмид. Однако в определенных ситуациях может наблюдаться феномен совместимости плазмид [47, 55–57]. Например, штаммы СРЕ, несущие гены *sre* и *spb2* на отдельной плазмиде штамма *CP* типа В, оказываются вполне совместимыми и способными экспрессироваться, повышая при этом вирулентность возбудителя. Как правило, у пожилых людей со сниженной перистальтикой кишечника и образованием «каловой» пробки или у пациентов в результате побочного действия лекарств в кишечнике создаются условия для длительного контакта СРЕ со слизистой кишечника. Моделирование описанной ситуации на животных позволило утверждать, что длительное присутствие энтеротоксина на слизистой кишечника способствует всасыванию токсина в кровоток и развитию энтеротоксемии с последующим поражением легких, почек и печени, развитием гиперкалиемии, обусловленной массовым выделением калия и развитием сердечной недостаточности с летальным исходом [46].

Штаммы *CP* типа С, продуцирующие энтеротоксин, способны вызвать развитие некротического энтерита у людей [4, 47], что подтверждается описанием двух тяжелых пищевых отравлений, вызванных энтеротоксигенным штаммом *CP* типа А, которые привели к гибели нескольких относительно молодых и здоровых людей. Эти вспышки произошли в психиатрических диспансерах Оклахомы и регистрировались у пациентов, принимающих психотропные препараты, способствующие образованию «каловой пробки» и, следовательно, снижению степени выраженности диарейного синдрома [4]. Сложившаяся ситуация в кишечнике способствовала длительному контакту между слизистой кишечника и токсинами, что, в конечном итоге, привело к процессу абсорбции СРЕ и микроциркуляции с последующим поражением других органов (печени, почек). Анализ результатов опытов на мышках и крысах с использованием очищенного энтеротокси-

на позволил выдвинуть научную гипотезу о синергидном характере действия СРЕ с бета-токсином при совместном их нахождении в просвете толстой кишки [4, 56], что вполне логично объясняет тяжесть течения и неблагоприятный исход заболевания у пациентов психиатрической клиники. Конечным следствием является то, что некоторые клетки *CP* в настоящее время несут несколько (по меньшей мере до 3) различных токсинных плазмид. При этом установленный сравнительно недавно феномен несовместимости плазмид [56], по-видимому, определяет некоторые ограничения общего репертуара токсинных плазмид, которые могут поддерживаться одной бактерией *CP*. Возможно, лучшим доказательством проблем несовместимости токсинной плазмиды является отсутствие её определенных комбинаций. Например, штаммы *CP*, несущие как йота-токсинные, так и сrb-токсинные плазмиды, никогда не идентифицируются [56]. СРЕ может способствовать в некоторых случаях некротическому энтериту, вызванному штаммами типа С. Некротический энтерит относится к пищевым заболеваниям, которые связаны с низким уровнем трипсина в кишечнике из-за заболевания и/или болезни [1, 4]. В то же время бета-токсин явно необходим для патогенеза некротического энтерита, и штаммы типа С, вызывающие это заболевание, также выделяют СРЕ [1, 3, 4]. Некоторые опыты над животными, использующие мутированный и очищенный токсин, продемонстрировали синергидное действие для СРЕ и бета-токсина [56]. Это позволяет предположить, что, присутствуя вместе с бета-токсином в кишечнике, СРЕ может влиять на течение некротического энтерита.

CP поддерживает большое количество генов токсина в различных конъюгативных плазмидах. Эта стратегия обеспечивает огромную пластичность и адаптивность вирулентности микроорганизма. Один из примеров, иллюстрирующих этот феномен, — наличие генов *spb* и *etx* на двух разных плазмидах. Штаммы *CP* типа С, несущие только плазмиду СРВ, вызывают заболевание у хозяев с более низким уровнем трипсина в кишечнике из-за возраста, диеты или заболевания, что позволяет СРВ сохраняться и действовать в кишечнике в течение более длительного периода времени. Напротив, штаммы *CP* типа D, несущие плазмиду ЕТХ, вызывают болезнь у животных с нормальным уровнем протеазы, которая протеолитически активизирует ЕТХ. Штаммы типа В, которые приобрели плазмиды как СРВ, так и ЕТХ, характеризуются универсальностью, способны вызвать заболевание при низких или нормальных уровнях кишечной протеазы [4, 56]. *CP* — не единственный патогенный клостридиальный вид, который использует плазмиды токсинов для вирулентности. Нейротоксины *C. botulinum* и *C. tetani* также могут кодироваться

плазмидой. Недавно было показано, что некоторые плазмиды, кодирующие ботулинический токсин, являются конъюгативными, возможно, с участием усеченного *tcp*-подобного локуса [8]. Поскольку *CP* относится к представителям нормальной флоры и, по-видимому, находится под селективным давлением остальной микробиоты кишечника, этот предполагаемый конъюгативный перенос токсинных плазмид в штаммы *CP*, не продуцирующие токсины, — путь к раскрытию патогенетических механизмов развития *CP*-инфекции ЖКТ.

Заболевания, обусловленные энтеропродуцирующими штаммами *CP* и связанные с непивевым путем передачи, характеризуются более тяжелым и длительным характером течения [1].

Некоторые переносимые плазмидой гены, контролирующие токсины, могут конъюгативно переноситься в другие виды клостридий. И поэтому не исключено, что этот межвидовой перенос плазмиды, несущей, например, ген ITX-подобного бинарного токсина, может повысить степень вирулентности реципиентов, таких как *C. difficile* и *C. spiroforme*. В этой связи логично признать возможное повышение вирулентности и у нетоксигенных штаммов *CP* в процессе межвидовой передачи генов, контролирующих тот или иной токсин (в том числе энтеротоксин) *CP*.

Клональность штаммов *CP* также является важным фактором, влияющим на вирулентность *CP*. Так, способность штаммов Darmbrand образовывать исключительно устойчивые споры, контролируемые хромосомным геном, связана с клональным процессом, произошедшим в хромосоме штаммов *CP*, вызывающих пищевые отравления у населения Германии во время Второй мировой войны [13, 53]. Штаммы птичьего некротического энтерита типа А также относятся к клональной линии *CP*, поскольку клетка патогена содержит, кроме плазмиды, несущей ген *netB*, дополнительный уникальный локус хромосомной патогенности NeLoc2 [1, 57].

К факторам, влияющим на вирулентность энтеротоксинпродуцирующих штаммов *CP*, относят способность гена *sre* индуцировать процесс перестройки плотного соединения клеток хозяина, процессы порообразования патогена и генерирования гидролитических ферментов и выживать в аэробных условиях [1, 58].

Рост *CP* стимулируют сахара, нуклеозиды, аминокислоты, соли и пурины [1]. Наряду с перечисленными веществами, первичные желчные кислоты, включая гликохолат, холат и таурохолат, регистрируемые, как известно, в ЖКТ человека, также действуют как стимуляторы роста на все виды рода *Clostridium*, тогда как вторичные желчные кислоты, такие как дезоксихолат натрия, оказывают ингибирующий эффект на рост микроорганизмов других родов, создавая селективные преимуще-

ства для клостридий, в том числе для *CP*. Наряду с этим короткое время генерации, характерное для клостридий (культивирование 8–12 мин при 43°C и в оптимальной для его роста среде — 12–17 мин при 37°C), на фоне развития глубоких декомпенсированных нарушений микробиоты кишечника определяет процессы активной колонизации возбудителя, формирования спор, их накопления и процессы споруляции с продукцией токсина. Присутствие солей желчных кислот ведет к активации главного регулятора споруляции Spo0A [1, 59].

Три сиалидазы, кодируемые генами *nanH*, *nanI* и *nanJ* в *CP*, усиливают действие токсина *CP*, подобно действиям, оказываемым ферментами нейраминидазой или экзосиалидазой (*nanI* и *nanJ*). Эта группа ферментов представляет важные факторы вирулентности во время тканевой инфекции, вызванной *CP*; они катализируют гидролиз концевых сиаловых кислот из гликопротеинов, гликолипидов и полисахаридов клеточных мембран, что способствует прикреплению бактерий к клеткам хозяина. Этот муколитический потенциал позволяет предположить, что *CP* использует кишечную слизь в качестве источника питательных веществ и тем самым усиливает колонизацию кишечной флоры. Исследования *in vitro* также показали, что α -токсин, связанный с NanI (экзо-альфа-сиалидаза), повышает вирулентность *CP*. Кроме того, было показано, что NanI повышает вирулентность ϵ -токсина, β -токсина и CPE [1, 60, 61].

Крупномасштабное геномное исследование 56 штаммов *CP*, выделенных из разных источников (от людей и проб внешней среды), выявило разнообразный пангеном (комплект генов в определенных геномах), включающий только 12,6% основных генов: гены, контролирующие действие α -токсина, α -клострипана, коллагеназы, гены, контролирующие порообразование, действие токсина PFO и энтеротоксина. Важно отметить, что преобладание гена *mprF*, устойчивого к аминогликозиду/антидефензину (100% детекции), и генов эффлюксного белка, устойчивого к тетрациклину, *tetA* (обнаружение более 75%), регистрируемые в геномах, подчеркивают потенциальную устойчивость к противомикробным препаратам, связанную с *CP*. Это исследование также показало, что разнообразные генетические вариации могут быть вызваны вставкой профагов в геномах, свободных от CRISPR (единой системы защиты профагов) [62].

Филогенетический анализ 109 изолятов *CP*, выделенных от людей и проб пищевых продуктов, полученных при пищевых отравлениях в Англии и Уэльсе в 2011–2017 гг., свидетельствовал, что все 9 вспышек пищевого отравления были обусловлены определенной группой типов *CP*, продуцирующих энтеротоксин (в 96,3% случаев), кодируемым плазмидным геном *sre*, и около 3% штаммов *CP*,

продуцирующих бета-2-токсин, и токсины F, контролируемых плазмидными генами *pcb2* и *pcf*. Это масштабное геномное исследование вспышек пищевого отравления позволило заключить, что в их основе лежали три основных типа токсинпродуцирующих штаммов *CP*, что подчеркивает уровень их распространенности и этиологической значимости [63]. Полученные результаты важно учитывать при прогнозировании характера течения пищевых отравлений, выборе тактики лечебных и профилактических мероприятий на определенных территориях.

Заключение

Многие годы проблемы здравоохранения и ветеринарной службы всего мира связаны с чрезвычайно распространённым и патогенным микроорганизмом — *CP*. Благодаря использованию молекулярно-генетических методов и адекватных моделей на животных расширены представления о биологии, генетике и эпидемиологии токсинпродуцирующих *CP* и сформулированы современные представления об их этиопатогенетических и генетических особенностях.

CP — анаэробная грамположительная, спорообразующая и токсинпродуцирующая палочка — распространена повсеместно в окружающей среде (в почве, продуктах питания, сточных водах), кишечнике людей, птиц и животных. Она относится к числу актуальных патогенов, является причиной развития гистотоксических инфекций, включая газовую гангрену (клостридиальный мионекроз), и заболеваний, возникающих в кишечнике, не связанных с пищевым фактором передачи (пищевые токсикоинфекции, энтерит, некротический энтерит, энтеротоксемия, спорадическая и антибиотикоассоциированная диарея).

Открытие новых факторов патогенности — токсинов и ферментов — определило разработку новой классификации токсинов и токсинотипов *CP*. Локусы гена *sre* энтеротоксина, кодирующие энтеротоксин штаммов *CP*, выделенных из объектов окружающей среды, как правило, несут ген *sre* на плаزمиде. Локусы *sre* штаммов *CP* типов С, D, E и NetF значительно отличаются от локусов гена *sre* штаммов *CP* типа А, продуцирующих энтеротоксин. Вспышки пищевого отравления *CP* могут быть вызваны не только энтеротоксином, контролируемым хромосомным геном *sre*, но и энтеротоксином, контролируемым плазмидным геном *sre*, ответственным за формирование чрезвычайно термостойких спор, что определяет развитие пищевого отравления с более тяжелым и длительным течением.

Обнаружение в продуктах розничной торговли, сточных водах, фекалиях человека, птиц и животных штаммов *СРЕ*, кодируемых как хромосомными, так и плазмидными генами *sre*, определяет новый взгляд на эпидемиологию заболеваний,

связанных с энтеротоксинпродуцирующими *CP*. В частности, человек может играть роль переносчика и резервуара штаммов *СРЕ*.

Установленная генетическая дивергенция в пангеноме конъюгативных плазмидных генов, связанных с вирулентностью *CP*, предполагает наличие дополнительных, новых генов, в первую очередь ответственных за развитие патологического процесса в кишечнике.

Локусы генов *sre* штаммов *CP* типов С, D, E и F отличаются друг от друга и характеризуются выраженным разнообразием. Так, штаммы *CP* типа С, несущие плазмиду *spb*, вызывают энтерит при низком уровне трипсина в кишечнике, что позволяет возбудителю сохраняться и действовать в кишечнике в течение более длительного периода времени. Напротив, штаммы *CP* типа D, несущие плазмиду *etx*, вызывают болезни у животных с нормальным уровнем протеазы. Штаммы *CP* типа В, которые приобрели плазмиды с генами *spb* и *etx*, обладают универсальностью, вызывая заболевание при низких и нормальных уровнях кишечной протеазы.

Энтеротоксинпродуцирующие штаммы *CP* способны содержать большой пул тесно связанных плазмид. Некоторые клетки *CP* могут вмещать до 3 плазмид, несущих различные гены вирулентности, которые определяют синергидный характер отношений между токсинами. И как альтернатива феномену синергидного характера действия определена проблема несовместимости плазмид, которые могут поддерживаться одной клеткой *CP*.

Конъюгативные плазмиды, несущие ген *sre*, способны переносить свой ген *sre* резидентным штаммам *CP*, тем самым влияя на вирулентные свойства штамма-реципиента.

Диета, различные заболевания, изменения микробиоты кишечника могут снижать активность трипсина в кишечнике — это условия для того, чтобы штамм *CP* с плазмидой, несущей ген *sre*, активно размножился, спорулировал и продуцировал энтеротоксин до уровня, способного вызвать патологический процесс в кишечнике или получить доступ к слизистой оболочке кишечника для проникновения в кровяное русло.

Наличие многих генов токсина *CP* на конъюгативных плаزمиде следует рассматривать как фактор, повышающий вирулентность штаммов за счет переноса плазмидой генов токсина в другие виды клостридий. Например, этот процесс может объяснить присутствие ИТХ-подобных бинарных токсинов в некоторых других патогенных клостридиальных видах, например *C. difficile* и *C. spiroforme*. Присутствие генов *tpel* на конъюгативных плазмиде у *CP* и широкое распространение среди патогенных клостридиальных видов генов, кодирующих большие гликозилирующие токсины, — путь к созданию дополнительных штаммов с уникаль-

ными характеристиками вирулентности. Клональность штаммов *CP* также является важным фактором, способствующим вирулентности возбудителя. Общий геномный фон между хромосомными штаммами типа А и Darmbrand позволяет продуцировать исключительно устойчивые споры, что, в свою очередь, увеличивает вирулентность. К другим факторам, оказывающим влияние на вирулентность энтеротоксинпродуцирующих штаммов *CP* (всех токсинотипов, продуцирующих энтеротоксин) как результат экспрессии гена *spe*, относятся изменения структуры плотного соединения, повышения активности процесса порообразования и устойчивости к кислоте, а также особенность выживать в аэробных условиях и активно колонизировать слизистую кишечника.

Несмотря на достигнутые успехи в решении актуальных проблем *CP*, многие важные вопросы в отношении биологии и генетики, а также патогенеза развития *CP*-ассоциированных заболеваний остаются открытыми. Полагаем, что ответы будут найдены при проведении крупномасштабных геномных исследований с использованием секвенирования изучаемых штаммов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Kiu R., Hall L.J. An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. *Emerg. Microb. Infect.* 2018; 7(1): 141. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0144-8>
2. Hobbs V.C., Smith M.T., Oakley C.L., Warrack G.H., Cruickshank J.C. *Clostridium welchii* food poisoning. *J. Hyg.* 1953; 51: 75–101. doi: 10.1017/S0022172400015515
3. McClane B.A., Uzal F.A., Miyakawa M.F., Lysterly D., Wilkins T.D. The enterotoxic clostridia. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer H., Stackebrandt E., eds. *The Prokaryotes*. New York: Springer NY Press; 2006: 688–752.
4. Freedman J.C., Shrestha A. *Clostridium perfringens* enterotoxin: action, genetics, and translational application. *Toxins (Basel)*. 2016; 8(3): 73. <https://doi.org/10.3390/toxins8030073>
5. Глотова Т.И., Терентьева Т.Е., Глотов А.Г. Возбудители и возрастная восприимчивость крупного рогатого скота к клостридиозам. *Сибирский вестник сельскохозяйственной науки*. 2017; 47(1): 90–6.
6. Терентьева Т.Е., Глотов А.Г., Глотова Т.И., Котенева С.В. Видовой спектр бактерий рода *Clostridium*, выделенных от крупного рогатого скота на молочных комплексах. *Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные*. 2016; (1): 5–9.
7. Мардер В., Капустин А.В., Щербаков П., Шилова Е. Проблема клостридиозов в молочном животноводстве. *БИО*. 2016; (5): 34–8.
8. Rood J.I., Adams V., Lacey J., Lyras D., McClane B.A., Melville S.B., et al. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. *Anaerobe*. 2018; 53: 5–10. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.04.011>
9. Yonogi S., Matsuda S., Kawai T., Yoda T., Harada T., Kumeda Y., et al. BEC, a novel enterotoxin of *Clostridium perfringens* found in human clinical isolates from acute gastroenteritis outbreaks. *Infect. Immun.* 2014; 82(6): 2390–9. <https://doi.org/10.1128/iai.01759-14>
10. Titball R.W., Naylor C.E., Basak A.K. The *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *Anaerobe*. 1999; 5(2): 51–64. <https://doi.org/10.1006/anae.1999.0191>
11. Sakurai J., Nagahama M., Oda M. *Clostridium perfringens* alpha-toxin: characterization and mode of action. *J. Biochem. (Tokyo)*. 2004; 136(5): 569–74. <https://doi.org/10.1093/jb/mvh161>
12. Rossjohn J., Polekhina G., Feil S.C., Morton C.J., Tweten R.K., Parker M.W. Structures of perfringolysin O suggest a pathway for activation of cholesterol-dependent cytolysins. *J. Mol. Biol.* 2007; 367(5): 1227–36. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.01.042>
13. Ma M., Li J., McClane B.A. Genotypic and phenotypic characterization of *Clostridium perfringens* isolates from Darmbrand cases in post-World War II Germany. *Infect. Immun.* 2012; 80(12): 4354–63. <https://doi.org/10.1128/iai.00818-12>
14. Bryant A.E., Chen R.Y., Nagata Y., Wang Y., Lee C.H., Finegold S., et al. Clostridial gas gangrene. I. Cellular and molecular mechanisms of microvascular dysfunction induced by exotoxins of *Clostridium perfringens*. *J. Infect. Dis.* 2000; 182(3): 799–807. <https://doi.org/10.1086/315756>
15. Hunter S.E.C., Brown J.E., Oynston P.C.F., Sakurai J., Titball R.W. Molecular genetic analysis of beta-toxin of *Clostridium perfringens* reveals sequence homology with alpha-toxin, gamma-toxin, and leukocidin of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 1993; 61: 3958–65. <https://doi.org/10.1128/iai.61.9.3958-3965.1993>
16. Macias Rioseco M., Beingesser J., Uzal F.A. Freezing or adding trypsin inhibitor to equine intestinal contents extends the lifespan of *Clostridium perfringens* beta-toxin for diagnostic purposes. *Anaerobe*. 2012; 18(3): 357–60. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.03.003>
17. Sakurai J., Duncan C.L. Some properties of the beta-toxin produced by *Clostridium perfringens* type C. *Infect. Immun.* 1978; 21(2): 678–80. <https://doi.org/10.1128/iai.21.2.678-680.1978>
18. Shatursky O., Bayles R., Rogers M., Jost B.H., Songer J.G., Tweten R.K. *Clostridium perfringens* beta-toxin forms potential-dependent, cation-selective channels in lipid bilayers. *Infect. Immun.* 2000; 68(10): 5546–51. <https://doi.org/10.1128/iai.68.10.5546-5551.2000>
19. Gibert M., Jolivet-Reynaud C., Popoff M.R. Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. *Gene*. 1997; 203(1): 65–73. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(97\)00493-9](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(97)00493-9)
20. Popoff M.R. Epsilon toxin: a fascinating pore-forming toxin. *FEBS J.* 2011; 278(23): 4602–15. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08145.x>
21. Bokori-Brown M., Savva C.G., Fernandes da Costa S.P., Naylor C.E., Basak A.K., Titball R.W. Molecular basis of toxicity of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. *FEBS J.* 2011; 278(23): 4589–601. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08140.x>
22. Minami J., Katayama S., Matsushita O., Matsushita C., Okabe A. Lambda-toxin of *Clostridium perfringens* activates the precursor of epsilon-toxin by releasing its N- and C-terminal peptides. *Microbiol. Immunol.* 1997; 41(7): 527–35. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1997.tb01888.x>
23. Miyata S., Matsushita O., Minami J., Katayama S., Shimamoto S., Okabe A. Cleavage of a C-terminal peptide is essential for heptamerization of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin in the synaptosomal membrane. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(17): 13778–83. <https://doi.org/10.1074/jbc.m011527200>
24. Robertson S.L., Li J., Uzal F.A., McClane B.A. Evidence for a prepore stage in the action of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. *PLoS One*. 2011; 6(7): e22053. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022053>
25. Nestorovich E.M., Karginov V.A., Bezrukov S.M. Polymer partitioning and ion selectivity suggest asymmetrical shape for the membrane pore formed by epsilon toxin. *Biophys. J.* 2010; 99(3): 782–9. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.05.014>
26. Sakurai J., Nagahama M., Oda M., Tsuge H., Kobayashi K. *Clostridium perfringens* iota-toxin: structure and function. *Toxins (Basel)*. 2009; 1(2): 208–28. <https://doi.org/10.3390/toxins1020208>

27. Stiles B.G., Wigelsworth D.J., Popoff M.R., Barth H. Clostridial binary toxins: iota and C2 family portraits. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2011; 1: 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2011.00011>
28. Barth H., Stiles B.G. Binary actin-ADP-ribosylating toxins and their use as molecular Trojan horses for drug delivery into eukaryotic cells. *Curr. Med. Chem.* 2008; 15(5): 459–69. <https://doi.org/10.2174/092986708783503195>
29. Manich M., Knapp O., Gibert M., Maier E., Jolivet-Reynaud C., Geny B. Clostridium perfringens delta toxin is sequence related to beta toxin, NetB, and Staphylococcus pore-forming toxins, but shows functional differences. *PLoS One.* 2008; 3(11): e3764. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003764>
30. Abildgaard L., Sondergaard T.E., Engberg R.M., Schramm A., Hojberg O. In vitro production of necrotic enteritis toxin B, NetB, by netB-positive and netB-negative Clostridium perfringens originating from healthy and diseased broiler chickens. *Vet. Microbiol.* 2010; 144(1-2): 231–5. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.12.036>
31. Yan X., Porter C.J., Hardy S.P., Steer D., Smith A.I., Quinsey N.S., et al. Structural and functional analysis of the pore-forming toxin NetB from Clostridium perfringens. *mBio.* 2013; 4(1): e00019–13. <https://doi.org/10.1128/mbio.00019-13>
32. Keyburn A.L., Bannam T.L., Moore R.J., Rood J.I. NetB, a pore-forming toxin from necrotic enteritis strains of Clostridium perfringens. *Toxins (Basel).* 2010; 2(7): 1913–27. <https://doi.org/10.3390/toxins2071913>
33. Engstrom B.E., Johansson A., Aspan A., Kaldhusdal M. Genetic relatedness and netB prevalence among environmental Clostridium perfringens strains associated with a broiler flock affected by mild necrotic enteritis. *Vet. Microbiol.* 2012; 159(1-2): 260–4. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.03.024>
34. Paredes-Sabja D., Sarker N., Sarker M.R. Clostridium perfringens tpeL is expressed during sporulation. *Microb. Pathog.* 2011; 51(5): 384–8. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2011.05.006>
35. Guttenberg G., Hornei S., Jank T., Schwan C., Lu W., Einsle O., et al. Molecular characteristics of Clostridium perfringens TpeL toxin and consequences of mono-O-GlcNAcylation of Ras in living cells. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(30): 24929–40. <https://doi.org/10.1074/jbc.m112.347773>
36. Nagahama M., Ohkubo A., Oda M., Kobayashi K., Amimoto K., Miyamoto K., et al. Clostridium perfringens TpeL glycosylates the Rac and Ras subfamily proteins. *Infect. Immun.* 2011; 79(2): 905–10. <https://doi.org/10.1128/iai.01019-10>
37. Coursodon C.F., Glock R.D., Moore K.L., Cooper K.K., Songer J.G. TpeL-producing strains of Clostridium perfringens type A are highly virulent for broiler chicks. *Anaerobe.* 2012; 18(1): 117–21. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.10.001>
38. Li J., Sayeed S., Robertson S., Chen J., McClane B.A. Sialidases affect the host cell adherence and epsilon toxin-induced cytotoxicity of Clostridium perfringens type D strain CN3718. *PLoS Pathog.* 2011; 7(12): e1002429i. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002429>
39. Chakrabarti G., McClane B.A. The importance of calcium influx, calpain, and calmodulin for the activation of Caco-2 cell death pathways by Clostridium perfringens enterotoxin. *Cell. Microbiol.* 2005; 7(1): 129–46. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00442.x>
40. McClane B.A., Robertson S.L., Li J. Clostridium perfringens. In: Doyle M.P., Buchanan R.L., eds. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Washington: ASM Press; 2013: 465–89.
41. Scallan E., Hoekstra R.M., Angulo F.J., Tauxe R.V., Widdowson M., Roy S., et al. Foodborne illness acquired in the United States — major pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(1): 7–15. <https://doi.org/10.3201/eid1701.p11101>
42. Hoffmann S., Batz M.B., Morris J.G. Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens. *J. Food Prot.* 2012; 75(7): 1292–302. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-11-417>
43. Li J., Paredes-Sabja D., Sarker M.R., McClane B.A. Further characterization of Clostridium perfringens small acid soluble protein-4 (Ssp4) properties and expression. *PLoS One.* 2009; 4(7): e6249. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006249>
44. Li J., McClane B.A. Evaluating the involvement of alternative sigma factors SigF and SigG in Clostridium perfringens sporulation and enterotoxin synthesis. *Infect. Immun.* 2010; 78(10): 4286–93. <https://doi.org/10.1128/iai.00528-10>
45. Smithee L., McClane B., Distefano R.F., Uzal F., Songer J.G., Mallonee S., et al. Fatal necrotizing colitis following a foodborne outbreak of enterotoxigenic Clostridium perfringens type A infection. *Clin. Infect. Dis.* 2005; 40(10): E78–83. <https://doi.org/10.1086/429829>
46. Garcia J.P., Li J., Shrestha A., Freedman J.C., Beingesser J., McClane B.A., et al. Clostridium perfringens type A enterotoxin damages the rabbit colon. *Infect. Immun.* 2014; 82(6): 2211–8.
47. Centers for Disease Control and prevention. Fatal foodborne Clostridium perfringens illness at a state psychiatric hospital—Louisiana, 2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2012; 61(32): 605–8.
48. Lindstrom M., Heikinheimo A., Korkeala H. Novel insights into the epidemiology of Clostridium perfringens type A food poisoning. *Food Microbiol.* 2011; 28(2): 192–8. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.020>
49. Heikinheimo A., Lindstrom M., Granum P.E., Korkeala H. Humans as reservoir for enterotoxin gene-carrying Clostridium perfringens type A. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12(11): 1724–9. <https://doi.org/10.3201/eid1211.060478>
50. Modi N., Wilcox M.H. Evidence for antibiotic induced Clostridium perfringens diarrhoea. *J. Clin. Pathol.* 2001; 54(10): 748–51. <https://doi.org/10.1136/jcp.54.10.748>
51. Carman R.J. Clostridium perfringens in spontaneous and antibiotic-associated diarrhoea of man and other animals. *Rev. Med. Microbiol.* 1997; 8(Suppl. 1): S43–5.
52. Machida Y. An outbreak of enterocolitis due to Clostridium perfringens in a hospital for the severely disabled. *Kansenshogaku Zasshi.* 1989; 63(4): 4106–6. <https://doi.org/10.11150/kansenshogakuzasshi1970.63.410> (in Japanese)
53. Hansen K. *Darmbrand — Enteritis Necroticans*. Stuttgart: George Thieme; 1949.
54. Murrell T.G., Roth L., Egerton J., Samels J., Walker P.D. Pig-Bel: enteritis necroticans. A study in diagnosis and management. *Lancet.* 1966; 1(7431): 217–22. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(66\)90048-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(66)90048-1)
55. Wisniewski J.A., Rood J.I. The Tcp conjugation system of Clostridium perfringens. *Plasmid.* 2017; 91: 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2017.03.001>
56. Li J., Adams B., Bannam T., Mijimoto K., et al. Toxin plasmids of Clostridium perfringens. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2013; 77(2): 208–233. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00062-12>
57. Kiu R., Brown J., Bedwell H., Leclair C., et al. Genomic analysis on broiler-associated Clostridium perfringens strains and exploratory caecal microbiome investigation reveals key factors linked to poultry necrotic enteritis. *Animal Microbiome.* 2019; 1(1): 12. <https://doi.org/10.1186/s42523-019-0015-1>
58. Li J., Freedman J.C., Evans D.R., McClane B.A. CodY promotes sporulation and enterotoxin production by Clostridium perfringens type A strain SM101. *Infect. Immun.* 2017; 85(3): e00855-16. <https://doi.org/10.1128/iai.00855-16>
59. Gilbert R.J. Cholesterol-dependent cytolysins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2010; 677: 56–66. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6327-7_5

ОБЗОРЫ

60. Llanco L.A., Nakano V., Avila-Campos M.J. Sialidase production and genetic diversity in *Clostridium perfringens* type A isolated from chicken with necrotic enteritis in Brazil. *Curr. Microbiol.* 2015; 70(3): 330–7. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0722-5>

61. Li J., McClane B.A. NanI sialidase can support the growth and survival of *Clostridium perfringens* strain F4969 using sialylated host macromolecules (Mucin) or Caco-2 cells. *Infect. Immun.* 2018; 86(2): e00547-17. <https://doi.org/10.1128/iai.00547-17>

62. Kiu R., Caim S., Alexander S., Pachori P., Hall L.J. Probing genomic aspects of the multi-host pathogen *Clostridium perfringens* reveals significant pangenome diversity, and a diverse array of virulence factors. *Front. Microbiol.* 2017; 8: 2485. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02485>

63. Kiu R., Caim S., Painset A., Pickard D., Swift C., Dougan G., et al. Phylogenomic analysis of gastroenteritis-associated *Clostridium perfringens* in England and Wales over a 7-year period indicates distribution of clonal toxigenic strains in multiple outbreaks and extensive involvement of enterotoxin-encoding (CPE) plasmids. *Microb. Genom.* 2019; 5(10): e000297. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000297>

REFERENCES

1. Kiu R., Hall L.J. An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. *Emerg. Microb. Infect.* 2018; 7(1): 141. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0144-8>

2. Hobbs B.C., Smith M.T., Oakley C.L., Warrack G.H., Cruickshank J.C. Clostridium welchii food poisoning. *J. Hyg.* 1953; 51: 75–101. doi: 10.1017/S0022172400015515

3. McClane B.A., Uzal F.A., Miyakawa M.F., Lyerly D., Wilkins T.D. The enterotoxic clostridia. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer H., Stackebrandt E., eds. *The Prokaryotes*. New York: Springer NY Press; 2006: 688–752.

4. Freedman J.C., Shrestha A. *Clostridium perfringens* enterotoxin: action, genetics, and translational application. *Toxins (Basel)*. 2016; 8(3): 73. <https://doi.org/10.3390/toxins8030073>

5. Glotova T.I., Terent'eva T.E., Glotov A.G. Pathogens and age susceptibility of cattle to clostridiosis. *Sibirskiy vestnik sel'skokhozyaystvennoy nauki*. 2017; 47(1): 90–6. (in Russian)

6. Terent'eva T.E., Glotov A.G., Glotova T.I., Koteneva S.V. Species spectrum of bacteria of genus clostridium isolated from cattle on dig dairy farms. *Rossiyskiy veterinarnyy zhurnal. Sel'skokhozyaystvennye zhivotnye*. 2016; (1): 5–9. (in Russian)

7. Marder V., Kapustin A.V., Shcherbakov P., Shilova E. The problem of clostridiosis in dairy farming. *BIO*. 2016; (5): 34–8. (in Russian)

8. Rood J.I., Adams V., Lacey J., Lyras D., McClane B.A., Melville S.B., et al. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. *Anaerobe*. 2018; 53: 5–10. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.04.011>

9. Yonogi S., Matsuda S., Kawai T., Yoda T., Harada T., Kumeda Y., et al. BEC, a novel enterotoxin of *Clostridium perfringens* found in human clinical isolates from acute gastroenteritis outbreaks. *Infect. Immun.* 2014; 82(6): 2390–9. <https://doi.org/10.1128/iai.01759-14>

10. Titball R.W., Naylor C.E., Basak A.K. The *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *Anaerobe*. 1999; 5(2): 51–64. <https://doi.org/10.1006/anae.1999.0191>

11. Sakurai J., Nagahama M., Oda M. *Clostridium perfringens* alpha-toxin: characterization and mode of action. *J. Biochem. (Tokyo)*. 2004; 136(5): 569–74. <https://doi.org/10.1093/jb/mvh161>

12. Rossjohn J., Polekhina G., Feil S.C., Morton C.J., Tweten R.K., Parker M.W. Structures of perfringolysin O suggest a pathway for activation of cholesterol-dependent cytolysins. *J. Mol. Biol.* 2007; 367(5): 1227–36. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.01.042>

13. Ma M., Li J., McClane B.A. Genotypic and phenotypic characterization of *Clostridium perfringens* isolates from Darmbrand cases in post-World War II Germany. *Infect. Immun.* 2012; 80(12): 4354–63. <https://doi.org/10.1128/iai.00818-12>

14. Bryant A.E., Chen R.Y., Nagata Y., Wang Y., Lee C.H., Finegold S., et al. Clostridial gas gangrene. I. Cellular and molecular mechanisms of microvascular dysfunction induced by exotoxins of *Clostridium perfringens*. *J. Infect. Dis.* 2000; 182(3): 799–807. <https://doi.org/10.1086/315756>

15. Hunter S.E.C., Brown J.E., Oynston P.C.F., Sakurai J., Titball R.W. Molecular genetic analysis of beta-toxin of *Clostridium perfringens* reveals sequence homology with alpha-toxin, gamma-toxin, and leukocidin of Staphylococcus aureus. *Infect. Immun.* 1993; 61: 3958–65. <https://doi.org/10.1128/iai.61.9.3958-3965.1993>

16. Macias Rioseco M., Beingesser J., Uzal F.A. Freezing or adding trypsin inhibitor to equine intestinal contents extends the lifespan of *Clostridium perfringens* beta-toxin for diagnostic purposes. *Anaerobe*. 2012; 18(3): 357–60. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.03.003>

17. Sakurai J., Duncan C.L. Some properties of the beta-toxin produced by *Clostridium perfringens* type C. *Infect. Immun.* 1978; 21(2): 678–80. <https://doi.org/10.1128/iai.21.2.678-680.1978>

18. Shatursky O., Bayles R., Rogers M., Jost B.H., Songer J.G., Tweten R.K. *Clostridium perfringens* beta-toxin forms potential-dependent, cation-selective channels in lipid bilayers. *Infect. Immun.* 2000; 68(10): 5546–51. <https://doi.org/10.1128/iai.68.10.5546-5551.2000>

19. Gibert M., Jolivet-Reynaud C., Popoff M.R. Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. *Gene*. 1997; 203(1): 65–73. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(97\)00493-9](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(97)00493-9)

20. Popoff M.R. Epsilon toxin: a fascinating pore-forming toxin. *FEBS J.* 2011; 278(23): 4602–15. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08145.x>

21. Bokori-Brown M., Savva C.G., Fernandes da Costa S.P., Naylor C.E., Basak A.K., Titball R.W. Molecular basis of toxicity of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. *FEBS J.* 2011; 278(23): 4589–601. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08140.x>

22. Minami J., Katayama S., Matsushita O., Matsushita C., Okabe A. Lambda-toxin of *Clostridium perfringens* activates the precursor of epsilon-toxin by releasing its N- and C-terminal peptides. *Microbiol. Immunol.* 1997; 41(7): 527–35. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1997.tb01888.x>

23. Miyata S., Matsushita O., Minami J., Katayama S., Shimamoto S., Okabe A. Cleavage of a C-terminal peptide is essential for heptamerization of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin in the synaptosomal membrane. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(17): 13778–83. <https://doi.org/10.1074/jbc.m011527200>

24. Robertson S.L., Li J., Uzal F.A., McClane B.A. Evidence for a prepore stage in the action of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. *PLoS One*. 2011; 6(7): e22053. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022053>

25. Nestorovich E.M., Karginov V.A., Bezrukov S.M. Polymer partitioning and ion selectivity suggest asymmetrical shape for the membrane pore formed by epsilon toxin. *Biophys. J.* 2010; 99(3): 782–9. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.05.014>

26. Sakurai J., Nagahama M., Oda M., Tsuge H., Kobayashi K. *Clostridium perfringens* iota-toxin: structure and function. *Toxins (Basel)*. 2009; 1(2): 208–28. <https://doi.org/10.3390/toxins1020208>

27. Stiles B.G., Wigelsworth D.J., Popoff M.R., Barth H. Clostridial binary toxins: iota and C2 family portraits. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2011; 1: 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2011.00011>

28. Barth H., Stiles B.G. Binary actin-ADP-ribosylating toxins and their use as molecular Trojan horses for drug delivery into eukaryotic cells. *Curr. Med. Chem.* 2008; 15(5): 459–69. <https://doi.org/10.2174/092986708783503195>

29. Manich M., Knapp O., Gibert M., Maier E., Jolivet-Reynaud C., Geny B. *Clostridium perfringens* delta toxin is sequence related to beta toxin, NetB, and Staphylococcus pore-forming to-

- xins, but shows functional differences. *PLoS One*. 2008; 3(11): e3764. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003764>
30. Abildgaard L., Sondergaard T.E., Engberg R.M., Schramm A., Hojberg O. In vitro production of necrotic enteritis toxin B, NetB, by netB-positive and netB-negative *Clostridium perfringens* originating from healthy and diseased broiler chickens. *Vet. Microbiol.* 2010; 144(1-2): 231–5. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.12.036>
 31. Yan X., Porter C.J., Hardy S.P., Steer D., Smith A.I., Quinsey N.S., et al. Structural and functional analysis of the pore-forming toxin NetB from *Clostridium perfringens*. *mBio*. 2013; 4(1): e00019–13. <https://doi.org/10.1128/mbio.00019-13>
 32. Keyburn A.L., Bannam T.L., Moore R.J., Rood J.I. NetB, a pore-forming toxin from necrotic enteritis strains of *Clostridium perfringens*. *Toxins (Basel)*. 2010; 2(7): 1913–27. <https://doi.org/10.3390/toxins2071913>
 33. Engstrom B.E., Johansson A., Aspan A., Kaldhusdal M. Genetic relatedness and netB prevalence among environmental *Clostridium perfringens* strains associated with a broiler flock affected by mild necrotic enteritis. *Vet. Microbiol.* 2012; 159(1-2): 260–4. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.03.024>
 34. Paredes-Sabja D., Sarker N., Sarker M.R. *Clostridium perfringens* tpeL is expressed during sporulation. *Microb. Pathog.* 2011; 51(5): 384–8. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2011.05.006>
 35. Guttenberg G., Hornei S., Jank T., Schwan C., Lu W., Einsle O., et al. Molecular characteristics of *Clostridium perfringens* TpeL toxin and consequences of mono-O-GlcNAcylation of Ras in living cells. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(30): 24929–40. <https://doi.org/10.1074/jbc.m112.347773>
 36. Nagahama M., Ohkubo A., Oda M., Kobayashi K., Amimoto K., Miyamoto K., et al. *Clostridium perfringens* TpeL glycosylates the Rac and Ras subfamily proteins. *Infect. Immun.* 2011; 79(2): 905–10. <https://doi.org/10.1128/iai.01019-10>
 37. Coursodon C.F., Glock R.D., Moore K.L., Cooper K.K., Songer J.G. TpeL-producing strains of *Clostridium perfringens* type A are highly virulent for broiler chicks. *Anaerobe*. 2012; 18(1): 117–21. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.10.001>
 38. Li J., Sayeed S., Robertson S., Chen J., McClane B.A. Sialidases affect the host cell adherence and epsilon toxin-induced cytotoxicity of *Clostridium perfringens* type D train CN3718. *PLoS Pathog.* 2011; 7(12): e1002429. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002429>
 39. Chakrabarti G., McClane B.A. The importance of calcium influx, calpain, and calmodulin for the activation of Caco-2 cell death pathways by *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Cell. Microbiol.* 2005; 7(1): 129–46. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00442.x>
 40. McClane B.A., Robertson S.L., Li J. *Clostridium perfringens*. In: Doyle M.P., Buchanan R.L., eds. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Washington: ASM Press; 2013: 465–89.
 41. Scallan E., Hoekstra R.M., Angulo F.J., Tauxe R.V., Widdowson M., Roy S., et al. Foodborne illness acquired in the United States – major pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(1): 7–15. <https://doi.org/10.3201/eid1701.p11101>
 42. Hoffmann S., Batz M.B., Morris J.G. Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens. *J. Food Prot.* 2012; 75(7): 1292–302. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-11-417>
 43. Li J., Paredes-Sabja D., Sarker M.R., McClane B.A. Further characterization of *Clostridium perfringens* small acid soluble protein-4 (Ssp4) properties and expression. *PLoS One*. 2009; 4(7): e6249. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006249>
 44. Li J., McClane B.A. Evaluating the involvement of alternative sigma factors SigF and SigG in *Clostridium perfringens* sporulation and enterotoxin synthesis. *Infect. Immun.* 2010; 78(10): 4286–93. <https://doi.org/10.1128/iai.00528-10>
 45. Smithee L., McClane B., Distefano R.F., Uzal F., Songer J.G., Mallonee S., et al. Fatal necrotizing colitis following a foodborne outbreak of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A infection. *Clin. Infect. Dis.* 2005; 40(10): E78–83. <https://doi.org/10.1086/429829>
 46. Garcia J.P., Li J., Shrestha A., Freedman J.C., Beingesser J., McClane B.A., et al. *Clostridium perfringens* type A enterotoxin damages the rabbit colon. *Infect. Immun.* 2014; 82(6): 2211–8.
 47. Centers for Disease Control and Prevention. Fatal foodborne *Clostridium perfringens* illness at a state psychiatric hospital—Louisiana, 2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2012; 61(32): 605–8.
 48. Lindstrom M., Heikinheimo A., Korkeala H. Novel insights into the epidemiology of *Clostridium perfringens* type A food poisoning. *Food Microbiol.* 2011; 28(2): 192–8. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.020>
 49. Heikinheimo A., Lindstrom M., Granum P.E., Korkeala H. Humans as reservoir for enterotoxin gene-carrying *Clostridium perfringens* type A. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12(11): 1724–9. <https://doi.org/10.3201/eid1211.060478>
 50. Modi N., Wilcox M.H. Evidence for antibiotic induced *Clostridium perfringens* diarrhoea. *J. Clin. Pathol.* 2001; 54(10): 748–51. <https://doi.org/10.1136/jcp.54.10.748>
 51. Carman R.J. *Clostridium perfringens* in spontaneous and antibiotic-associated diarrhoea of man and other animals. *Rev. Med. Microbiol.* 1997; 8(Suppl. 1): S43–5.
 52. Machida Y. An outbreak of enterocolitis due to *Clostridium perfringens* in a hospital for the severely disabled. *Kansenshogaku Zasshi*. 1989; 63(4): 4106–6. (in Japanese) <https://doi.org/10.11150/kansenshogakuzasshi1970.63.410>
 53. Hansen K. *Darmbrand – Enteritis Necroticans*. Stuttgart: Georg Thieme; 1949.
 54. Murrell T.G., Roth L., Egerton J., Samels J., Walker P.D. Pig-Bel: enteritis necroticans. A study in diagnosis and management. *Lancet*. 1966; 1(7431): 217–22. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(66\)90048-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(66)90048-1)
 55. Wisniewski J.A., Rood J.I. The Tcp conjugation system of *Clostridium perfringens*. *Plasmid*. 2017; 91: 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2017.03.001>
 56. Li J., Adams B., Bannam T., Mijimoto K., et al. Toxin plasmids of *Clostridium perfringens*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2013; 77(2): 208–233. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00062-12>
 57. Kiu R., Brown J., Bedwell H., Leclairel C., et al. Genomic analysis on broiler-associated *Clostridium perfringens* strains and exploratory caecal microbiome investigation reveals key factors linked to poultry necrotic enteritis. *Animal Microbiome*. 2019;(1):12. <https://doi.org/10.1186/s42523-019-0015-1>
 58. Li J., Freedman J.C., Evans D.R., McClane B.A. CodY promotes sporulation and enterotoxin production by *Clostridium perfringens* type A strain SM101. *Infect. Immun.* 2017; 85(3): e00855-16. <https://doi.org/10.1128/iai.00855-16>
 59. Gilbert R.J. Cholesterol-dependent cytolysins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2010; 677: 56–66. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6327-7_5
 60. Llanco LA., Nakano V., Avila-Campos M.J. Sialidase production and genetic diversity in *Clostridium perfringens* type A isolated from chicken with necrotic enteritis in Brazil. *Curr. Microbiol.* 2015; 70(3): 330–7. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0722-5>
 61. Li J., McClane B.A. NanI sialidase can support the growth and survival of *Clostridium perfringens* strain F4969 using sialylated host macromolecules (Mucin) or Caco-2 cells. *Infect. Immun.* 2018; 86(2):e00547-17. <https://doi.org/10.1128/iai.00547-17>
 62. Kiu R., Caim S., Alexander S., Pachori P., Hall L.J. Probing genomic aspects of the multi-host pathogen *Clostridium perfringens* reveals significant pangenome diversity, and a diverse array of virulence factors. *Front. Microbiol.* 2017; 8: 2485. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02485>

63. Kiu R., Caim S., Painset A., Pickard D., Swift C., Dougan G., et al. Phylogenomic analysis of gastroenteritis-associated *Clostridium perfringens* in England and Wales over a 7-year period indicates distribution of clonal toxigenic strains in multiple

outbreaks and extensive involvement of enterotoxin-encoding (CPE) plasmids. *Microb. Genom.* 2019; 5(10): e000297. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000297>

Информация об авторах

Лобзин Юрий Владимирович — д.м.н., проф., акад. РАН, директор ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6934-2223>.

Кветная Ася Степановна[✉] — д.м.н., проф., в.н.с. отдела медицинской микробиологии и молекулярной микробиологии ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия, asya41@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8939-2973>.

Скрипченко Наталья Викторовна — д.м.н., проф., зам. директора по научной работе ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия, <http://orcid.org/0000-0001-8927-3176>.

Железова Людмила Ильинична — к.м.н., с.н.с. отдела медицинской микробиологии и молекулярной микробиологии ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8071-3243>.

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

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

Статья поступила в редакцию 29.04.2020;
принята к публикации 10.12.2020; опубликована 25.02.2021.

Information about the authors

Yuri V. Lobzin — D. Sci. (Med.), Prof., Full Member of RAS, director, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Saint Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6934-2223>.

Asya S. Kvetnaya[✉] — D. Sci. (Med.), Prof., leading researcher, Department of medical microbiology and molecular microbiology, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Saint Petersburg, Russia, asya41@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8939-2973>.

Natalya V. Skripchenko — D. Sci. (Med.), Prof., deputy director for science, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Saint Petersburg, Russia, <http://orcid.org/0000-0001-8927-3176>.

Lyudmila I. Zhelezova — PhD (Med.), senior researcher, Department of medical microbiology and molecular microbiology, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Saint Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8071-3243>.

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

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

The article was submitted 29.04.2020;
accepted for publication 10.12.2020; published 25.02.2021.

Научный обзор

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-11>

Аллергенсодержащие вакцины для специфической иммунотерапии

Петрова С.Ю.[✉], Хлгатян С.В., Бержец В.М., Васильева А.В.

Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия

Аннотация

Аллергенспецифическую иммунотерапию (АСИТ) используют более 100 лет для лечения пациентов с IgE-опосредованными аллергическими заболеваниями. В последние два десятилетия наиболее распространённые лечебные аллергены были получены с помощью технологии молекулярного клонирования. Для повышения безопасности иммунотерапии создана большая группа генетически модифицированных аллергенов со сниженной аллергенной активностью. Механизм действия данных лечебных аллергенов отличается от такового природных экстрактов аллергенов, и необходимы дополнительные исследования, чтобы понять, как происходит десенсибилизация в каждом случае.

Целью обзора является ознакомление читателей с новыми лечебными аллергенсодержащими вакцинами, особенностями их структурной модификации и иммунологическим воздействием на организм.

Мы провели анализ и систематизацию представленных в литературе экспериментальных разработок по основным направлениям создания новых вакцин от аллергии: гипоаллергенных производных рекомбинантных аллергенов, вакцин, содержащих антигены с Т-эпитопами, и вакцин, содержащих антигены с В-эпитопами, ДНК-вакцин. Нам удалось выявить сильные и слабые стороны основных направлений модификации рекомбинантных аллергенов. Все представленные в обзоре аллергенсодержащие вакцины решают поставленные исследователями задачи: в экспериментальных моделях на животных они формируют иммуногенность или толерантность, в клинических испытаниях снижают симптомы аллергических реакций. Оценка эффективности предлагаемых вакцин довольно высока, но требуются их дальнейшие доклинические и клинические испытания для подтверждения безопасности и безвредности.

Ключевые слова: обзор, аллергены, аллергенспецифическая иммунотерапия, гипоаллергенные производные рекомбинантных аллергенов, Т-эпитопсодержащие вакцины, В-эпитопсодержащие вакцины, ДНК-вакцины

Финансирование. Государственный источник финансирования плановой темы НИР «Разработка новых лекарственных форм аллергенов из клещей домашней пыли».

Для цитирования: Петрова С.Ю., Хлгатян С.В., Бержец В.М., Васильева А.В. Аллергенсодержащие вакцины для специфической иммунотерапии. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021; 98(1): 104–112. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-11>

Reviews

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-11>

Allergy vaccines for specific immunotherapy

Stanislava Yu. Petrova[✉], Svetlana V. Khlgatian, Valentina M. Berzhets, Anna V. Vasileva

I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Abstract

Allergen-specific immunotherapy (ASIT) has been used for more than a hundred years to treat patients with IgE-mediated allergic diseases. The most common allergens have been obtained using molecular cloning technology in the past two decades. To increase the safety of immunotherapy, a large group of genetically modified allergens with reduced allergenic activity was created. The mechanism of action of these therapeutic allergens differs from natural allergen extracts, and more research is needed to understand how desensitization occurs in each case.

The objective of this review is to introduce readers to new therapeutic allergy vaccines and their structural modification features as well as immunological effects on the body. To achieve this objective, we have analyzed and systematized the experimental developments presented in the literature on the main directions of creating new allergy vaccines: hypoallergenic derivatives of recombinant allergens, T cell epitope-based allergy vaccines and B cell epitope-based allergy vaccines, DNA vaccines.

Summing up the results of the research presented in the literature, it is necessary to note the high heterogeneity of designs used to achieve the high efficiency of the developed therapeutic allergens. All allergy vaccines presented in the review solve the tasks set by the researchers: in experimental animal models they induce immunogenicity or tolerance, in clinical trials they reduce the symptoms of allergic reactions. The effectiveness of the proposed medicinal products is quite high but its evaluation requires further long-term preclinical and clinical trials to confirm the safety and harmlessness of the created allergy vaccines.

Keywords: *review, allergens, allergen-specific immunotherapy, hypoallergenic derivatives of recombinant allergens, T cell-epitope based allergy vaccines, B cell-epitope based allergy vaccines, encapsulated allergens, DNA vaccines*

Funding. The state source of funding for the planned research topic «Development of new medicinal forms of allergens from house dust mites».

For citation: Petrova S.Yu., Khlgatian S.V., Berzhets V.M., Vasileva A.V. Allergy vaccines for specific immunotherapy. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii.* 2021;98(1):104–112.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-11>

Введение

IgE-опосредованные аллергические заболевания занимают важное место среди болезней человека [1]. Аллергенспецифическая иммунотерапия (АСИТ) является единственным примером лечения, воздействующего на патогенетические звенья IgE-опосредованного аллергического процесса с длительным профилактическим эффектом после завершения лечебных курсов [2].

В последние два десятилетия появилось множество экспериментальных исследований по созданию и изучению аллергенсодержащих вакцин, предназначенных для АСИТ. Данное обстоятельство диктует необходимость систематизации и анализа значительного информационного потока научных публикаций на эту тему.

Целью настоящего обзора является ознакомление читателей с новыми лечебными аллергенсодержащими вакцинами, особенностями их строения и иммунологическим воздействием на организм.

Лекарственные формы, основанные на нативных аллергенах

Нативные водно-солевые экстракты аллергенов (ВСА) используются при АСИТ более 100 лет и полностью доказали свою эффективность [3, 4]. Однако терапия ВСА не является безопасной и удобной. При АСИТ данными аллергенами существует вероятность возникновения множества системных и местных побочных эффектов, вплоть до анафилактического шока. АСИТ нативными экстрактами занимает много времени у пациента и врача и требует максимального контроля [2, 5, 6].

Для снижения аллергенности и увеличения иммуногенности ВСА методом полимеризации формальдегидом или глутаральдегидом были созданы химически модифицированные формы лечебных препаратов аллергенов. Такие препараты были названы аллергоидами [2, 6, 7]. Полагают, что усиление иммуногенности аллергоида связано с увели-

чением его молекулярной массы и наличием в нём более жёстких внутримолекулярных связей [8], а снижение аллергенности — с блокадой его IgE-связывающих эпитопов альдегидными группами [8].

Существуют аллергоиды и для сублингвальной иммунотерапии. Они могут быть получены путем обработки аллергенных экстрактов янтарным и малеиновым ангидридами, цианатом калия [6]. Низкая молекулярная масса данных мономерных аллергоидов позволяет им всасываться через слизистые оболочки [7]. В настоящее время некоторые из аллергоидов эффективно используются в клинической практике [7, 9]. В фазе клинических испытаний в России находятся конъюгированные формы аллергоидов с полиоксидонием — аллерготропины. Иммуногенность аллерготропинов подтверждена как на лабораторных животных, так и на добровольцах [2, 8].

Несмотря на значительные успехи науки в совершенствовании препаратов лечебных аллергенов, получаемых из природного сырья, многие проблемы до конца решить не удалось. Прежде всего это проблемы, связанные с недостаточным качеством и высокой аллергенной активностью [9–11]. Риск системных побочных эффектов сохраняется и у аллергоидов [7, 9], и у аллерготропинов [8].

Рекомбинантные аллергены

Широкое внедрение рекомбинантных технологий в производство белков аллергенов открыло новые возможности перед АСИТ. На современном этапе развития технологии рекомбинантной ДНК можно получать безопасные вакцины против аллергии, которые позволяют преодолеть многие, если не все, проблемы, связанные с использованием натуральных экстрактов аллергенов. Возможности генетических модификаций полученных рекомбинантных аллергенных молекул здесь поистине безграничны [10–16].

Наиболее перспективными к дальнейшим разработкам для практического применения признаны

три направления в модификации рекомбинантных аллергенов:

- гипоаллергенные производные рекомбинантных аллергенов;
- вакцины, состоящие из Т-клеточных эпитопов;
- вакцины, состоящие из В-клеточных эпитопов и высокоиммуногенных белков-носителей.

Гипоаллергенные производные рекомбинантных аллергенов

Создания гипоаллергенных производных рекомбинантных аллергенов добиваются конформационным изменением белковой молекулы, удалением, разрушением или трансформацией аминокислот или пептидов, участвующих в связывании IgE [11, 12], а также изменением структуры аллергена путем замены последовательности аминокислот и фрагментацией белка [11].

Смысл вакцинации гипоаллергенными производными рекомбинантных аллергенов в том, что формирование IgG при иммунном ответе возможно к любым 5–8 гидрофильным пептидам длиной 10–15 аминокислот на поверхностно экспонированном участке дикого аллергена. Это связано с тем, что в организме имеется большое разнообразие В-клеточных рецепторов, за счет чего в норме иммунная система может распознавать все имеющиеся в природе патогены. Специфичность и аффинность продуцируемых ими антител по ходу иммунного ответа возрастает. Вырабатываемые в результате иммунизации IgG блокируют связывание природного аллергена с IgE у пациентов с аллергией [17].

Положительные стороны вакцинации гипоаллергенными производными рекомбинантных аллергенов:

а) отсутствие или снижение IgE-опосредованных реакций немедленного типа при проведении иммунотерапии;

б) способность вызывать при иммунизации аллергенспецифический IgG-ответ к природному аллергену, несмотря на то что гипоаллергенные фрагменты белков теряют часть нативной структуры [11, 12, 18–20].

Отрицательной стороной данной вакцинации является возможность индукции аллергического воспаления клеточного типа [11, 12, 18]

Вакцины, содержащие антигены с Т-клеточными эпитопами

Разработка данных вакцин затруднительна, т.к. главный комплекс гистосовместимости (МНС) имеет высокую степень полиморфизма, а последнее, как известно, осложняет его связывание с Т-клеточными эпитопами [21, 22].

Однако эта проблема решаема. Обнаружено, что различные молекулы человеческого лейкоци-

тарного антигена (HLA) могут связывать сходные аминокислотные последовательности пептидов, что позволило исследователям объединить их в группы, известные как супертипы HLA [23, 24]. Кроме того, существуют универсальные пептиды, способные связываться с несколькими супертипами HLA. Последним и отдается предпочтение при создании вакцин [20]. Данные стратегии позволяют использовать ограниченное число пептидов для разработки вакцин, содержащих антигены Т-клеточных эпитопов [21–24]. Функционально иммунодоминантные пептиды идентифицируют *in vitro* по их способности приводить к пролиферации и секреции цитокинов (интерферон- γ , IL-10 и IL-13) и по их сниженной или отсутствующей способности связывать IgE [23].

Поиски многих исследователей акцентируются на обнаружении привязки отдельного Т-эпитопа аллергена к выработке определённого интерлейкина, что могло бы целенаправленно искажать иммунный ответ [21, 22]. Хотя уже имеются данные о том, что некоторые CD4-Т-клеточные эпитопы стимулируют специфические подмножества Th [21]. Прошедшие такой двойной отбор Т-эпитопы и составляют основу пептидов, входящих в вакцину. Данные пептиды — это рекомбинантно синтезированные молекулы, представляющие собой иммунодоминантные Т-эпитопы, перекрывающиеся по связыванию с супертипами HLA [23]. Смысл стратегии в том, что вакцинация данными Т-клеточными эпитопами аллергенов приводит к индукции Т-клеточной толерантности, механизм которой до конца не изучен. Возможно, толерантность связана с влияниями Treg, продукцией интерлейкина-10, дальнейшим повышением соотношения Th1/Th2 и последующим долгосрочным эффектом [18, 22, 23, 25].

При проведении иммунотерапии Т-эпитопами препаратов аллергенов В-клетки остаются интактными. В некоторых исследованиях все же отмечают индукцию аллергенспецифических IgG на вакцины, содержащие антигены с Т-клеточными эпитопами. Данный факт свидетельствует о наличии сохранных В-эпитопов в данных вакцинах [18, 26].

Положительные стороны вакцинации аллергенами с Т-клеточными эпитопами:

а) отсутствие IgE-зависимых реакций немедленного типа при проведении иммунотерапии [18, 27, 28];

б) изменение экспрессии цитокинов, свидетельствующее о нарастании Т-клеточной толерантности [18, 25, 29];

в) устойчивые клинические преимущества после относительно короткого курса лечения по сравнению с использующимися в настоящее время в медицинской практике АСИТ и сублингвальной иммунотерапией [25, 30, 31].

Отрицательные стороны данной вакцинации — возможность индукции аллергического воспадения клеточного типа [16, 18, 21].

Примером исследования возможности рекомбинантной вакцины, содержащей антигены с Т-клеточными эпитопами, целенаправленно искажать иммунный ответ может служить изучение 5 коротких пептидов, полученных из основного аллергена пыльцы оливы. Эти пептиды были определены как иммунодоминантные и как возможные иммунорегуляторные Т-клеточные эпитопы. Доклинические испытания с кровью пациентов, страдающих IgE-опосредованными реакциями на пыльцу оливы, выявили полное отсутствие способности индуцировать активацию базофилов *in vitro* у всех 5 пептидов в различных комбинациях. У 2 из исследуемых пептидов отмечена 30% способность ингибировать пролиферативный ответ к экстракту аллергена. В ответ на эти 2 пептида обнаружена статистически значимая секреция интерлейкина-10 и -35 в культуре мононуклеаров аллергических больных, что доказывает их иммунорегуляторную способность [32]. Следовательно, два вышеуказанных пептида являются наиболее предпочтительными кандидатами для вакцинации и формирования толерантности к аллергенам у пациентов.

Вакцины, содержащие антигены В-клеточных эпитопов и высокоиммуногенных белков-носителей

Для создания данных вакцин гипоаллергенные пептиды В-клеточных эпитопов сшиваются с неаллергенными и высокоиммуногенными белками-носителями. Такая технология позволяет получить вакцину, способную индуцировать контролируемый протективный гуморальный IgG-опосредованный иммунный ответ против как нативного аллергена, так и белка-носителя [11, 12, 17, 18, 33–37]. Механизм иммунного ответа при данной вакцинации основан на принципе гаптен–носитель [11, 38, 39]. Рецептор В-клетки (BCR) специфически узнаёт и связывает сохраняющуюся часть В-эпитопа аллергена. В-клетка процессирует и представляет Т-хелперу белковую гибридную молекулу в виде пептида белка-носителя, что способствует продукции IgG-антител [11, 38, 39].

Положительные стороны вакцинации аллергенами с В-клеточными эпитопами:

- а) не происходит системных анафилактических и поздних Т-клеточных реакций [21, 36, 39];
- б) вырабатываются блокирующие IgG-антитела к нативному аллергену [11, 34, 36, 39].

Подобный тип вакцин способствует формированию комбинированного иммунного ответа на аллерген и белок-носитель [17, 39].

Интересна по своей структуре рекомбинантная, основанная на В-клеточных эпитопах вакцина VM32 для АСИТ. Эта вакцина, адсорбированная на

гидроксиде алюминия, содержит рекомбинантные, сшитые аллерген-производные белки. Они состоят из неаллергенных пептидов В-клеточных эпитопов: четырёх основных главных аллергенов пыльцы тимфеевки и поверхностного белка гепатита В домена PreS. Проведено рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое исследование данной вакцины. Двухлетняя АСИТ, состоящая из 2 курсов 3 предсезонных инъекций VM32 и 1 инъекции после сезона пыления тимфеевки, индуцировала IgG4-ответ, более выраженный после 2-го года терапии. В результате проведения АСИТ VM32 у пациентов отсутствовали аллергенспецифические провоспалительные цитокиновые реакции и был снижен уровень специфического IgE, индуцированного сезонным воздействием пыльцы. Кроме того, отмечено улучшение клинического состояния пациентов и отсутствие усиления Т-клеточных реакций против нативных аллергенов пыльцы травы [2, 40, 41].

Капсулированные аллергены

Некоторые созданные учёными вакцины трудно отнести к описанным в данном обзоре направлениям. При этом они обещают быть очень перспективными при АСИТ. Возможно, механизм воздействия данных лечебных аллергенов отличается от механизма действия вышеперечисленных вакцин и необходимы дополнительные исследования для его понимания. В данных лечебных аллергенах поверхностные структуры белка экранированы, что препятствует связыванию аллергена как с иммуноглобулинами, так и с В-клетками [42, 43]. Такой препарат не вызывает IgE-опосредованных аллергических реакций [42, 44], но успешно захватывается антигенпрезентирующими клетками. Он содержит полный набор Т-эпитопов аллергена и, следовательно, может вызывать при иммунотерапии изменение характера иммунного ответа [44, 45].

Примером таких вакцин является капсулированный рекомбинантный клещевой аллерген, созданный в Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Рекомбинантные белки домашних пылевых клещей *Dermatophagoides farinae* (Der f 1 и Der f 2) погружали в хитозановый матрикс и затем формировали полимерную оболочку. Полученные наночастицы типа ядро–оболочка позволяли экранировать от распознавания специфичными антителами содержащиеся в них рекомбинантные белки [43, 44]. С помощью сывороток больных с клещевой сенсibilизацией доказано, что полученная вакцина не связывает аллергенспецифические IgE-антитела [44]. Удобный размер наночастиц 90–140 нм обеспечивает их быстрый и полный фагоцитоз, что является необходимым условием как для иммуногенности аллергена, так и для его безопасности [44]. Клеточный ответ на данный капсулированный ал-

лерген, оцениваемый по пролиферации спленоцитов иммунизированных мышей [43, 44], и IgG-ответ сопоставимы с ответами на рекомбинантный белок [44]. По окончании экспериментального и клинического изучения разрабатываемый препарат может быть в дальнейшем использован для АСИТ в более высоких концентрациях, чем нативные аллергены, что приведет к сокращению срока лечения [44]. Вероятно, капсулированный аллерген сохраняет часть антигенных детерминант, необходимых для связывания с В-клеткой, о чем свидетельствуют модельные эксперименты по формированию IgG-ответа.

ДНК-вакцины

Вакцинация ДНК имеет большой потенциал как эффективное профилактическое и терапевтическое решение для АСИТ [2]. ДНК-вакцины обладают рядом преимуществ по сравнению с традиционными вакцинами, включая низкую стоимость, простоту разработки и производства, удобство введения. Они эффективны в индукции CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеточного иммунитета и гуморальных иммунных реакций на многих животных моделях [46–49]. Для получения ДНК-вакцины требуется встроить ген, кодирующий интересующий белок, в специальный плазмидный вектор [46]. Длительное время плазида существует в ядре клетки в виде эписомы, не встраиваясь в геном, и поддерживает синтез кодируемых ею белков в течение недель или месяцев [46]. Синтезированные антигены обрабатываются в протеасомах и подвергаются презентации цитотоксическим Т-лимфоцитам (CD8⁺), что формирует соответствующий характер цитокиновой регуляции иммунного ответа [38]. Благодаря доминирующему цитокиновому окружению и характеру презентации антигена МНСI происходит клональная экспансия цитотоксических Т-лимфоцитов, Th0-клетки трансформируются в Th1-клетки, продуцирующие γ -интерферон и ИЛ-2 [2, 46]. При существующем сниженном соотношении Th1/Th2 у пациентов с IgE-опосредованными аллергическими реакциями это должно способствовать изменению иммунологического реагирования на аллерген и синтезу специфических IgG [47]. Однако в многочисленных исследованиях после ДНК-вакцинации часто обнаруживают низкую выработку антител у людей и крупных животных [48].

Для усиления иммуногенности ДНК-вакцин используются различные способы [48–50]. Рассмотрим основное решение данной проблемы на примере разработки препарата из ДНК иммунодоминантных эпитопов аллергенов пыльцы японского кедра CryJ1 или CryJ2 в конструкции с лизосомально-ассоциированным мембранным протеином (LAMP-1), который является резидентным белком лизосомы. Включение лизосомальных векторных последовательностей LAMP-1 в плазмиды ДНК направляет синтезированный в антигенпрезенти-

рующих клетках антиген из протеасомного пути в лизосомный путь, в результате чего аллерген в комплексе с МНСII представляется на их мембране CD4⁺-лимфоциту, что значительно усиливает иммуногенность данных антигенов. Целевое направление белков на деградацию в лизосомы уменьшает секрецию клетками аллергена в межклеточное пространство и тем самым снижает вероятность аллергических реакций. Для проверки иммунологического эффекта вакцин CryJ-LAMP ими иммунизировали мышей, что привело к высоким уровням анти-CryJ1- или анти-CryJ2-IgG2a-антител и умеренным уровням IgG1-антител, а также к низким уровням IgE-антител. Экспериментальные результаты также доказали, что вакцинация CryJ2-LAMP может подавлять активацию и/или функцию базофилов и индуцировать CD4⁺-Т-клеточную память. При этом ДНК-вакцина сохраняет эффективность в стимуляции сильного ответа CD8⁺-Т-клеток, что связано, скорее всего, с возможностью обработки части аллергена в протеасомах и последующего представления его МНСI. Данный факт способствует выработке высоких уровней γ -интерферона и, соответственно, искажению иммунного ответа в сторону Th1. Интересно, что на экспериментальных моделях в этом исследовании доказано, что иммунологические эффекты данных ДНК-вакцин не связаны с классическим механизмом действия АСИТ, а именно с Treg-клетками и интерлейкином-10 [51]. Хотя существуют исследования, где ДНК-вакцина, в которой также использовали лизосомально-ассоциированный мембранный протеин, индуцировала Treg-клетки [52].

Изучение ДНК-вакцин при atopических состояниях проводят как для решения вопроса о возможности лечения уже сформировавшихся аллергических реакций, так и для профилактики сенсibilизации пациентов с atopией к новым аллергенам [52, 53].

Заключение

Подводя итог анализируемым исследованиям, представленным в литературе, необходимо отметить высокую гетерогенность дизайнов создания новых современных аллергенсодержащих вакцин. При этом все же нам удалось выявить основные сильные и слабые стороны трёх основных направлений в модификации рекомбинантных аллергенов. Все представленные в обзоре аллергенсодержащие вакцины решают поставленные исследователями задачи: в экспериментальных моделях на животных они формируют иммуногенность или толерантность, в клинических испытаниях снижают симптомы аллергических реакций. Оценка эффективности предлагаемых лечебных препаратов довольно высока, но требует дальнейших длительных доклинических и клинических испытаний для подтверждения безопасности и безвредности созданных аллергенсодержащих вакцин. Что же касается ДНК-вакцин,

то даже при новых подходах к вакцинации, описанных нами ранее, для подтверждения их иммунотерапевтической значимости необходимы доклинические испытания на приматах.

Таким образом, современные препараты аллергенов, находящиеся на доклинических и клинических стадиях разработки и исследований, в большинстве случаев резко снижают системные побочные реакции и обладают эффективностью, а также позволяют победить ещё одну из самых непростых проблем АСИТ — длительность и многократность курсов лечения [31, 32, 44, 54].

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Петрова С.Ю., Хлгатын С.В., Бержец В.М., Радикова О.В. Современная концепция патогенеза atopических заболеваний. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2019; (1): 72–9. <https://doi.org/10.14427/jipai.2019.1.72>
- Петрова С.Ю., Бержец В.М., Петрова Н.С., Хрулёва В.А., Емельянов О.Ю., Хлгатын С.В. и др. Перспективы развития лечебных форм аллергенов. От абстрактных проблем к конкретным решениям. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2018; (1): 40–7. <https://doi.org/10.14427/jipai.2018.1.40>
- Calderon M.A., Casale T.B., Togias A., Bousquet J., Durham S.R., Demoly P. Allergen-specific immunotherapy for respiratory allergies: from meta-analysis to regulation and beyond. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011; 127(4): 30–8. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.08.024>
- Meadows A., Kaambwa B., Novielli N., Huissoon A., Fry-Smith A., Meads C., et al. A systematic review and economic evaluation of subcutaneous and sublingual allergen immunotherapy in adults and children with seasonal allergic rhinitis. *Health Technol. Assess.* 2013; 17(27): 1–322. <https://doi.org/10.3310/hta17270>
- Lockey R.F. "ARIA": global guidelines and new forms of allergen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001; 108(4): 497–9. <https://doi.org/10.1067/mai.2001.118638>
- Бержец В.М., Бабахин А.А., Петрова Н.С., Васильева А.В., Хлгатын С.В., Емельянова О.Ю. Новые формы клещевых аллергоидов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019; 96(3): 15–21. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-3-15-21>
- Данилычева И.В., Ильина Н.И., Шульженко А.Е. Опыт применения карбамиллированного мономерного аллергоида Lais® для сублингвальной иммунотерапии пациентов с аллергическим риноконъюнктивитом, вызванным пылью злаковых трав. *Российский аллергологический журнал*. 2013; (6): 58–63.
- Петров Р.В., Хайтов Р.М., Некрасов А.В., Федосеева В.Н., Пучкова Н.Г., Камышева В.А. и др. Аллерготропин для лечения поллинозов и способ лечения поллинозов. Патент РФ №2205661; 2001.
- Nguyen N.T., Raskopf E., Shah-Hosseini K., Zadoyan G., Mösges R. A review of allergoid immunotherapy: is cat allergy a suitable target? *Immunotherapy*. 2016; 8(3): 331–49. <https://doi.org/10.2217/imt.15.121>
- Makatsori M., Pfaar O., Leonart R., Calderon M.A. Recombinant allergen immunotherapy: clinical evidence of efficacy – a review. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2013; 13(4): 371–80. <https://doi.org/10.1007/s11882-013-0359-7>
- Valenta R., Niespodziana K., Focke-Tejkl M., Marth K., Huber H., Neubauer A. Recombinant allergens: What does the future hold? *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011; 127(4): 860–4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.02.016>
- Valenta R., Linhart B., Swoboda I., Niederberger V. Recombinant allergens for allergen-specific immunotherapy: 10 years anniversary of immunotherapy with recombinant allergens. *Allergy*. 2011; 66(6): 775–83. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2011.02565.x>
- Linhart B., Valenta R. Mechanisms underlying allergy vaccination with recombinant hypoallergenic allergen derivatives. *Vaccine*. 2012; 30(29): 4328–35. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.11.011>
- Chen K.W., Blatt K., Thomas W.R., Swoboda I., Valent P., Valenta R., et al. Hypoallergenic Der p 1/Der p 2 combination vaccines for immunotherapy of house dust mite allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2012; 130(2): 435–43. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.05.035>
- Valenta R., Ferreira F., Focke-Tejkl M., Marth K., Huber H., Neubauer A., et al. From allergen genes to allergy vaccines. *Annu. Rev. Immunol.* 2010; 28: 211–41. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.02.016>
- Valenta R. The future of antigen-specific immunotherapy of allergy. *Nat. Rev. Immunol.* 2002; 2(6): 446–53. <https://doi.org/10.1038/nri824>
- Свирицкая Е.В., Алексеева Л.Г. Гетерологичный пептидный мини антиген в составе полимерной частицы для создания противоаллергенной вакцины. Патент РФ № 2480479; 2013.
- Marth K., Focke-Tejkl M., Lupinek Ch., Valenta R., Niederberger V. Allergen peptides, recombinant allergens and hypoallergens for allergen-specific immunotherapy. *Curr. Treat. Options Allergy*. 2014; 1(1): 91–106. <https://doi.org/10.1007/s40521-013-0006-5>
- Sircar G., Jana K., Dasgupta A., Saha S., Gupta Bhattacharya S. Epitope mapping of Rhi o 1 and generation of a hypoallergenic variant: a candidate molecule for fungal allergy vaccines. *J. Biol. Chem.* 2016; 291(34): 18016–29. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.732032>
- Martínez D., Munera M., Cantillo J.F., Wortmann J., Zakzuk J., Keller W., et al. An engineered hybrid protein from Dermatophagoides pteronyssinus allergens shows hypoallergenicity. *J. Mol. Sci.* 2019; 20(12): 3025. <https://doi.org/10.3390/ijms20123025>
- Sanchez-Trincado J.L., Gomez-Perosanz M., Reche P.A. Fundamentals and methods for T- and B-cell epitope prediction. *J. Immunol. Res.* 2017; 2017: 2680160. <https://doi.org/10.1155/2017/2680160>
- Woodfolk J.A. T-cell responses to allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2007; 119(2): 280–94. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.11.008>
- Worm M., Lee H.H., Kleine-Tebbe J., Hafner R.P., Laidler P., Healey D., et al. Development and preliminary clinical evaluation of a peptide immunotherapy vaccine for cat allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011; 127(1): 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.11.029>
- Greenbaum J., Sidney J., Chung J., Brander C., Peters B., Sette A. Functional classification of class II human leukocyte antigen (HLA) molecules reveals seven different supertypes and a surprising degree of repertoire sharing across supertypes. *Immunogenetics*. 2011; 63(6): 325–35. <https://doi.org/10.1007/s00251-011-0513-0>
- Patel D., Couroux P., Hickey P., Salapatek A.M., Laidler P., Larché M., et al. Fel d 1-derived peptide antigen desensitization shows a persistent treatment effect 1 year after the start of dosing: a randomized, placebo-controlled study. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013; 131(1): 103–9. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.07.028>
- Sancho A.L., Wallner M., Hauser M., Nagl B., Himly M., Asam C., et al. T cell epitope containing domains of ragweed Amb a 1 and mugwort Art v 6 modulate immunologic responses in humans and mice. *PLoS One*. 2017; 12(1): e0169784. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169784>

27. Tonti E., Larch M. Concepts and perspectives on peptide-based immunotherapy in allergy. *Allergo J. Int.* 2016; 25(6): 144–53. <https://doi.org/10.1007/s40629-016-0126-0>
28. Pellaton C., Perrin Y., Boudousquie C., Barbier N., Wassenberg J., Corradin G., et al. Novel birch pollen specific immunotherapy formulation based on contiguous overlapping peptides. *Clin. Transl. Allergy.* 2013; 3(1): 17. <https://doi.org/10.1186/2045-7022-3-17>
29. Akdis M. New treatments for allergen immunotherapy. *World Allergy Organ. J.* 2014; 7(1): 23. <https://doi.org/10.1186/1939-4551-7-23>
30. Hafner R.P., Couroux P., Salapatek A., Hickey P., Laidler P., Larché M., et al. Immunotherapy – 2080 Fel d 1 derived peptide antigen desensitization results in a persistent treatment effect on symptoms of cat allergy 1 year after 4 doses. *World Allergy Organ. Journal.* 2013; 6(1): 162. <https://doi.org/10.1186/1939-4551-6-S1-P162>
31. Cox L., Compalati E., Kundig T., Larche M. New directions in immunotherapy. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2013; 13(2): 178–95. <https://doi.org/10.1007/s11882-012-0335-7>
32. Calzada D., Cremades-Jimeno L., Pedro M.Á., Baos S., Rial M., Sastre J., et al. Therapeutic potential of peptides from Ole e 1 in olive-pollen allergy. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 15942. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52286-3>
33. Focke-Tejkl M., Weber M., Niespodziana K., Neubauer A., Huber H., Henning R., et al. Development and characterization of a recombinant, hypoallergenic, peptide-based vaccine for grass pollen allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2015; 130(5): 1207–7. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.09.012>
34. Twaroch T.E., Focke M., Fleischmann K., Balic N., Lupinek C., Blatt K., et al. Carrier-bound Alt a 1 peptides without allergenic activity for vaccination against *Alternaria alternata* allergy. *Clin. Exp. Allergy.* 2012; 42(6): 966–75. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2012.03996>
35. Edlmayr J., Niespodziana K., Focke-Tejkl M., Linhart B., Valenta R. Allergen-specific immunotherapy: towards combination vaccines for allergic and infectious diseases. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2011; 352: 121–40. https://doi.org/10.1007/82_2011_130
36. Marth K., Breyer L., Focke-Tejkl M., Blatt K., Shamji M.H., Layhadi J., et al. A nonallergenic birch pollen allergy vaccine consisting of hepatitis PreS-fused Bet v 1 peptides focuses blocking IgG toward IgE epitopes and shifts immune responses to a tolerogenic and Th1 phenotype. *J. Immunol.* 2013; 190(7): 3068–78. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202441>
37. Бурместер Г.Р., Педутто А. *Наглядная иммунология*. М.: Лаборатория знаний; 2018.
38. Niespodziana K., Focke-Tejkl M., Linhart B., Civaj V., Blatt K., Valent P., et al. A hypoallergenic cat vaccine based on Fel d 1-derived peptides fused to hepatitis B PreS. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011; 127(6): 1562–7. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.02.004>
39. Twaroch T.E., Focke M., Civaj V., Weber M., Balic N., Mari A., et al. Carrier-bound, nonallergenic Ole e 1 peptides for vaccination against olive pollen allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011; 128(1): 178–84. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.03.011>
40. Ziegelmayer P., Focke-Tejkl M., Schmutz R., Lemell P., Ziegelmayer R., Weber M., et al. Mechanisms, safety and efficacy of a B cell epitope-based vaccine for immunotherapy of grass pollen allergy. *EBioMedicine.* 2016; 11: 43–57. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.08.02>
41. Eckl-Dorna J., Weber M., Stanek V., Linhart B., Ristl R., Waltl E.E., et al. Two years of treatment with the recombinant grass pollen allergy vaccine BM32 induces a continuously increasing allergen-specific IgG response. *EBioMedicine.* 2019; 50: 421–32. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.11.006.E1>
42. Каширина Е.И., Решетов П.Д., Алексеева Л.Г., Зубов В.П., Свирищевская Е.В. Иммуногенность белков, капсулированных в полимерные наночастицы на основе хитозана-альгината. *Российский иммунологический журнал*. 2014; 8(3): 901–4.
43. Каширина Е.И., Решетов П.Д., Алексеева Л.Г., Хлгатян С.В., Рязанцев Д.Ю., Гурьянова С.В. и др. Капсулирование аллергенов клещей домашней пыли в наночастицы на основе хитозана и альгината. *Российские нанотехнологии*. 2015; 10(7-8): 94–100.
44. Kashirina E., Reshetov P., Alekseeva L., Berzhets V., Ryazantsev D., Zubov V., et al. Encapsulation of allergens into chitosan-alginate nanoparticles prevents IgE binding. *J. Vaccine Vaccination.* 2018; 4(2): 012. Available at: https://jacobspublishers.com/uploads/article_pdf/50/scientific_50_1137_27052019034441.pdf
45. Yu H.Q., Liu Z.G., Guo H., Zhou Y.P. Therapeutic effect on murine asthma with sublingual use of *Dermatophagoides farinae*/chitosan nanoparticle vaccine. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi.* 2011; 29(1): 4–9. (in Chinese)
46. Чубукова О.В., Никоноров Ю.М. Перспективы применения ДНК-вакцин в профилактике хантавирусных инфекций. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2008; (2): 37–40.
47. Liu M.A. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunol. Rev.* 2011; 239(1): 62–84. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00980>
48. Lu S. Immunogenicity of DNA vaccines in humans: It takes two to tango. *Human Vaccines.* 2008; 4(6): 449–52. <https://doi.org/10.4161/hv.4.6.6179>
49. Marques E.T., Chikhlikar P., de Arruda L.B., Leao I.C., Lu Y., Wong J., et al. HIV-1 p55Gag encoded in the lysosome-associated membrane protein-1 as a DNA plasmid vaccine chimera is highly expressed, traffics to the major histocompatibility class II compartment, and elicits enhanced immune responses. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(39): 37926–36. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303336200>
50. Graham B.S., Enama M.E., Nason M.C., Gordon I.J., Peel S.A., Ledgerwood J.E., et al. DNA vaccine delivered by a needle-free injection device improves potency of priming for antibody and CD8+ T-cell responses after rAd5 boost in a randomized clinical trial. *PLoS One.* 2013; 8(4): e59340. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059340>
51. Su Y., Connolly M., Marketon A., Heiland T. CryJ-LAMP DNA vaccines for Japanese Red Cedar allergy induce robust Th1 type immune responses in murine model. *J. Immunol. Res.* 2016; 2016: 4857869. <https://doi.org/10.1155/2016/4857869>
52. Weinberger E.E., Isakovic A., Scheiblhofer S., Ramsauer C., Reiter K., Hauser-Kronberger C., et al. The influence of antigen targeting to sub-cellular compartments on the anti-allergic potential of a DNA vaccine. *Vaccine.* 2013; 31(51): 6113–21. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.08.005>
53. Zhu Z., Yu J., Niu Y., Sun S., Liu Y., Saxon A., et al. Prophylactic and therapeutic effects of polylysine-modified Ara h 2 DNA vaccine in a mouse model of peanut allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2017; 171(3-4): 241–50. <https://doi.org/10.1159/000453264>
54. Soliman M., Ellis A.K. The role of synthetic peptide immunoregulatory epitope (SPIRE) in the treatment of allergic disease. *Curr. Treat. Options Allergy.* 2017; 4(1): 22–9. <https://doi.org/10.1007/s40521-017-0115-7>

REFERENCES

1. Petrova S.Yu., Khlgatyan S.V., Berzhets V.M., Radikova O.V. Modern concept of pathogenesis of atopic diseases. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya.* 2019; (1): 72–9. <https://doi.org/10.14427/jipai.2019.1.72> (in Russian)
2. Petrova S.Yu., Berzhets V.M., Petrova N.S., Khruleva V.A., Emel'yanov O.Yu., Khlgatyan S.V., et al. Future prospect of allergens' medical forms. From abstract problems to concrete solutions. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya.* 2018; (1): 40–7. <https://doi.org/10.14427/jipai.2018.1.40> (in Russian)
3. Calderon M.A., Casale T.B., Togias A., Bousquet J., Durham S.R., Demoly P. Allergen-specific immunotherapy for

- respiratory allergies: from meta-analysis to regulation and beyond. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011; 127(4): 30–8. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.08.024>
4. Meadows A., Kaambwa B., Novielli N., Huissoon A., Fry-Smith A., Meads C., et al. A systematic review and economic evaluation of subcutaneous and sublingual allergen immunotherapy in adults and children with seasonal allergic rhinitis. *Health Technol. Assess.* 2013; 17(27): 1–322. <https://doi.org/10.3310/hta17270>
 5. Lockey R.F. "ARIA": global guidelines and new forms of allergen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001; 108(4): 497–9. <https://doi.org/10.1067/mai.2001.118638>
 6. Berzhets V.M., Babakhin A.A., Petrova N.S., Vasil'eva A.V., Khl'gatyan S.V., Emel'yanova O.Yu. New forms of home dust mite allergoid. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2019; 96(3): 15–21. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-3-15-21> (in Russian)
 7. Danilycheva I.V., Il'ina N.I., Shul'zhenko A.E. Experience with the carbamylated monomeric allergoid Lais ® for sublingual immunotherapy in patients with grass pollen-induced allergic rhinoconjunctivitis. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal.* 2013; (6): 58–63. (in Russian)
 8. Petrov R.V., Khaïtov R.M., Nekrasov A.V., Fedoseeva V.N., Puchkova N.G., Kamysheva V.A., et al. Allergotropin for treating pollinosis and method for treating pollinosis. Patent RF №2205661; 2001. (in Russian)
 9. Nguyen N.T., Raskopf E., Shah-Hosseini K., Zadoyan G., Mösges R. A review of allergoid immunotherapy: is cat allergy a suitable target? *Immunotherapy.* 2016; 8(3): 331–49. <https://doi.org/10.2217/imt.15.121>
 10. Makatsori M., Pfaar O., Leonart R., Calderon M.A. Recombinant allergen immunotherapy: clinical evidence of efficacy – a review. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2013; 13(4): 371–80. <https://doi.org/10.1007/s11882-013-0359-7>
 11. Valenta R., Niespodziana K., Focke-Tejkl M., Marth K., Huber H., Neubauer A. Recombinant allergens: What does the future hold? *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011; 127(4): 860–4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.02.016>
 12. Valenta R., Linhart B., Swoboda I., Niederberger V. Recombinant allergens for allergen-specific immunotherapy: 10 years anniversary of immunotherapy with recombinant allergens. *Allergy.* 2011; 66(6): 775–83. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2011.02565.x>
 13. Linhart B., Valenta R. Mechanisms underlying allergy vaccination with recombinant hypoallergenic allergen derivatives. *Vaccine.* 2012; 30(29): 4328–35. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.11.011>
 14. Chen K.W., Blatt K., Thomas W.R., Swoboda I., Valent P., Valenta R., et al. Hypoallergenic Der p 1/Der p 2 combination vaccines for immunotherapy of house dust mite allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2012; 130(2): 435–43. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.05.035>
 15. Valenta R., Ferreira F., Focke-Tejkl M., Marth K., Huber H., Neubauer A., et al. From allergen genes to allergy vaccines. *Annu. Rev. Immunol.* 2010; 28: 211–41. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.02.016>
 16. Valenta R. The future of antigen-specific immunotherapy of allergy. *Nat. Rev. Immunol.* 2002; 2(6): 446–53. <https://doi.org/10.1038/nri824>
 17. Svirshchevskaya E.V., Alekseeva L.G. Heterologous peptide mini-antigene in polymer particle for making anti-allergy vaccine. Patent RF № 2480479; 2013. (in Russian)
 18. Marth K., Focke-Tejkl M., Lupinek Ch., Valenta R., Niederberger V. Allergen peptides, recombinant allergens and hypoallergens for allergen-specific immunotherapy. *Curr. Treat. Options Allergy.* 2014; 1(1): 91–106. <https://doi.org/10.1007/s40521-013-0006-5>
 19. Sircar G., Jana K., Dasgupta A., Saha S., Gupta Bhattacharya S. Epitope mapping of Rhi o 1 and generation of a hypoallergenic variant: a candidate molecule for fungal allergy vaccines. *J Biol. Chem.* 2016; 291(34): 18016–29. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.732032>
 20. Martínez D., Munera M., Cantillo J.F., Wortmann J., Zakzuk J., Keller W., et al. An engineered hybrid protein from Dermatophagoides pteronyssinus allergens shows hypoallergenicity. *J. Mol. Sci.* 2019; 20(12): 3025. <https://doi.org/10.3390/ijms20123025>
 21. Sanchez-Trincado J.L., Gomez-Perosanz M., Reche P.A. Fundamentals and methods for T- and B-cell epitope prediction. *J. Immunol. Res.* 2017; 2017: 2680160. <https://doi.org/10.1155/2017/2680160>
 22. Woodfolk J.A. T-cell responses to allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2007; 119(2): 280–94. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.11.008>
 23. Worm M., Lee H.H., Kleine-Tebbe J., Hafner R.P., Laidler P., Healey D., et al. Development and preliminary clinical evaluation of a peptide immunotherapy vaccine for cat allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011; 127(1): 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.11.029>
 24. Greenbaum J., Sidney J., Chung J., Brander C., Peters B., Sette A. Functional classification of class II human leukocyte antigen (HLA) molecules reveals seven different supertypes and a surprising degree of repertoire sharing across supertypes. *Immunogenetics.* 2011; 63(6): 325–35. <https://doi.org/10.1007/s00251-011-0513-0>
 25. Patel D., Couroux P., Hickey P., Salapatek A.M., Laidler P., Larché M., et al. Fel d 1-derived peptide antigen desensitization shows a persistent treatment effect 1 year after the start of dosing: a randomized, placebo-controlled study. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013; 131(1): 103–9. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.07.028>
 26. Sancho A.I., Wallner M., Hauser M., Nagl B., Himly M., Asam C., et al. T cell epitope containing domains of ragweed Amb a 1 and mugwort Art v 6 modulate immunologic responses in humans and mice. *PLoS One.* 2017; 12(1): e0169784. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169784>
 27. Tonti E., Larch M. Concepts and perspectives on peptide-based immunotherapy in allergy. *Allergo J. Int.* 2016; 25(6): 144–53. <https://doi.org/10.1007/s40629-016-0126-0>
 28. Pellaton C., Perrin Y., Boudousquie C., Barbier N., Wassenberg J., Corradin G., et al. Novel birch pollen specific immunotherapy formulation based on contiguous overlapping peptides. *Clin. Transl. Allergy.* 2013; 3(1): 17. <https://doi.org/10.1186/2045-7022-3-17>
 29. Akdis M. New treatments for allergen immunotherapy. *World Allergy Organ. J.* 2014; 7(1): 23. <https://doi.org/10.1186/1939-4551-7-23>
 30. Hafner R.P., Couroux P., Salapatek A., Hickey P., Laidler P., Larché M., et al. Immunotherapy – 2080 Fel d 1 derived peptide antigen desensitization results in a persistent treatment effect on symptoms of cat allergy 1 year after 4 doses. *World Allergy Organ. Journal.* 2013; 6(1): 162. <https://doi.org/10.1186/1939-4551-6-S1-P162>
 31. Cox L., Compalati E., Kundig T., Larche M. New directions in immunotherapy. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2013; 13(2): 178–95. <https://doi.org/10.1007/s11882-012-0335-7>
 32. Calzada D., Cremades-Jimeno L., Pedro M.Á., Baos S., Rial M., Sastre J., et al. Therapeutic potential of peptides from Ole e 1 in olive-pollen allergy. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 15942. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52286-3>
 33. Focke-Tejkl M., Weber M., Niespodziana K., Neubauer A., Huber H., Henning R., et al. Development and characterization of a recombinant, hypoallergenic, peptide-based vaccine for grass pollen allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2015; 130(5): 1207–7. e1-11. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.09.012>
 34. Twaroch T.E., Focke M., Fleischmann K., Balic N., Lupinek C., Blatt K., et al. Carrier-bound Alt a 1 peptides without allergenic activity for vaccination against Alternaria alternata allergy. *Clin.*

- Exp. Allergy*. 2012; 42(6): 966–75.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2012.03996>
35. Edlmayr J., Niespodziana K., Focke-Tejkl M., Linhart B., Valenta R. Allergen-specific immunotherapy: towards combination vaccines for allergic and infectious diseases. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2011; 352: 121–40.
https://doi.org/10.1007/82_2011_130
 36. Marth K., Breyer I., Focke-Tejkl M., Blatt K., Shamji M.H., Layhadi J., et al. A nonallergenic birch pollen allergy vaccine consisting of hepatitis PreS-fused Bet v 1 peptides focuses blocking IgG toward IgE epitopes and shifts immune responses to a tolerogenic and Th1 phenotype. *J. Immunol.* 2013; 190(7): 3068–78. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202441>
 37. Burmester G.R., Petsutto A. *Visual Immunology [Naglyadnaya immunologiya]*. Moscow: Laboratoriya znaniy; 2018. (in Russian)
 38. Niespodziana K., Focke-Tejkl M., Linhart B., Civaj V., Blatt K., Valent P., et al. A hypoallergenic cat vaccine based on Fel d 1-derived peptides fused to hepatitis B PreS. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011; 127(6): 1562–7.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.02.004>
 39. Twaroch T.E., Focke M., Civaj V., Weber M., Balic N., Mari A., et al. Carrier-bound, nonallergenic Ole e 1 peptides for vaccination against olive pollen allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011; 128(1): 178–84. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.03.011>
 40. Ziegelmayer P., Focke-Tejkl M., Schmutz R., Lemell P., Ziegelmayer R., Weber M., et al. Mechanisms, safety and efficacy of a B cell epitope-based vaccine for immunotherapy of grass pollen allergy. *EBioMedicine*. 2016; 11: 43–57.
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.08.02>
 41. Eckl-Dorna J., Weber M., Stanek V., Linhart B., Ristl R., Waltl E.E., et al. Two years of treatment with the recombinant grass pollen allergy vaccine BM32 induces a continuously increasing allergen-specific IgG response. *EBioMedicine*. 2019; 50: 421–32. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.11.006.E1>
 42. Kashirina E.I., Reshetov P.D., Alekseeva L.G., Zubov V.P., Svirshchevskaya E.V. Immunogenicity of proteins encapsulated into polymeric chitosan-alginate nanoparticles. *Rossiyskiy immunologicheskij zhurnal*. 2014; 8(3): 901–4. (in Russian)
 43. Kashirina E.I., Reshetov P.D., Alekseeva L.G., Khlgatyan S.V., Ryazantsev D.Yu, Zubov V.P., et al. Capsulation of house-dust-mite allergens into nanoparticles developed from chitosan and alginate. *Nanotechnologies in Russia*. 2015; 10(7-8): 627–35.
<https://doi.org/10.1134/S1995078015040084>
 44. Kashirina E., Reshetov P., Alekseeva L., Berzhets V., Ryazantsev D., Zubov V., et al. Encapsulation of allergens into chitosan-alginate nanoparticles prevents IgE binding. *J. J. Vaccine Vaccination*. 2018; 4(2): 012. Available at: https://jacobspublishers.com/uploads/article_pdf/50/scientific_50_1137_27052019034441.pdf
 45. Yu H.Q., Liu Z.G., Guo H., Zhou Y.P. Therapeutic effect on murine asthma with sublingual use of Dermatophagoides farinae/chitosan nanoparticle vaccine. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*. 2011; 29(1): 4–9. (in Chinese)
 46. Chubukova O.V., Nikonorov Yu.M. Prospects of application of DNA-vaccines in preventive maintenance of the hantaviral infection. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2008; (2): 37–40. (in Russian)
 47. Liu M.A. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunol. Rev.* 2011; 239(1): 62–84.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00980>
 48. Lu S. Immunogenicity of DNA vaccines in humans: It takes two to tango. *Human Vaccines*. 2008; 4(6): 449–52.
<https://doi.org/10.4161/hv.4.6.6179>
 49. Marques E.T., Chikhlikar P., de Arruda L.B., Leao I.C., Lu Y., Wong J., et al. HIV-1 p55Gag encoded in the lysosome-associated membrane protein-1 as a DNA plasmid vaccine chimera is highly expressed, traffics to the major histocompatibility class II compartment, and elicits enhanced immune responses. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(39): 37926–36.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M303336200>
 50. Graham B.S., Enama M.E., Nason M.C., Gordon I.J., Peel S.A., Ledgerwood J.E., et al. DNA vaccine delivered by a needle-free injection device improves potency of priming for antibody and CD8+ T-cell responses after rAd5 boost in a randomized clinical trial. *PLoS One*. 2013; 8(4): e59340.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059340>
 51. Su Y., Connolly M., Marketon A., Heiland T. CryJ-LAMP DNA vaccines for Japanese Red Cedar allergy induce robust Th1 type immune responses in murine model. *J. Immunol. Res.* 2016; 2016: 4857869. <https://doi.org/10.1155/2016/4857869>
 52. Weinberger E.E., Isakovic A., Scheibhofer S., Ramsauer C., Reiter K., Hauser-Kronberger C., et al. The influence of antigen targeting to sub-cellular compartments on the anti-allergic potential of a DNA vaccine. *Vaccine*. 2013; 31(51): 6113–21.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.08.005>
 53. Zhu Z., Yu J., Niu Y., Sun S., Liu Y., Saxon A., et al. Prophylactic and therapeutic effects of polylysine-modified Ara h 2 DNA vaccine in a mouse model of peanut allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2017; 171(3-4): 241–50.
<https://doi.org/10.1159/000453264>
 54. Soliman M., Ellis A.K. The role of synthetic peptide immunoregulatory epitope (SPIRE) in the treatment of allergic disease. *Curr. Treat. Options Allergy*. 2017; 4(1): 22–9.
<https://doi.org/10.1007/s40521-017-0115-7>

Информация об авторах

Петрова Станислава Юрьевна[✉] — к.м.н., с.н.с. лаб. по разработке аллергенов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, laball@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3034-0148>

Хлгатян Светлана Вагинаковна — д.б.н., в.н.с. лаб. по разработке аллергенов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8354-7682>

Бержец Валентина Михайловна — д.б.н., проф. зав. лаб. по разработке аллергенов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5055-7593>

Васильева Анна Викторовна — н.с. лаб. по разработке аллергенов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7703-2698>

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

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

Статья поступила в редакцию 04.03.2020;
принята к публикации 01.08.2020, опубликована 25.02.2021.

Information about the authors

Stanislava Yu. Petrova[✉] — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of allergens, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, laball@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3034-0148>

Svetlana V. Khlgatyan — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of allergens, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8354-7682>

Valentina M. Berzhets — D. Sci. (Biol.), Prof., Head, Laboratory of allergens, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5055-7593>

Anna V. Vasilyeva — researcher, Laboratory of allergens, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7703-2698>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

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

The article was submitted 04.03.2020;
accepted for publication 01.08.2020; published 25.02.2021.

ИСТОРИЯ НАУКИ

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-98>



Пандемия испанки 1918 года в России. Вопросы сто лет спустя

Морозова О.М.^{1✉}, Трошина Т.И.^{2,3}, Морозова Е.Н.⁴, Морозов А.Н.⁵

¹ФГБОУ ВО «Донской государственный технический университет», 344000, Ростов-на-Дону, Россия;

²ФГАОУ ВО «Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова», 163002, Архангельск, Россия;

³ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет», 163000, Архангельск, Россия;

⁴Элмбрук мемориал госпитал, 53045, Брукфилд, Висконсин, США;

⁵МУБУ «Клинико-диагностический центр “Здоровье” города Ростова-на-Дону», 344011, Ростов-на-Дону, Россия

Течение пандемии испанки на территории бывшей Российской империи является малоизученной темой, в том числе в связи с неблагоприятным состоянием медико-санитарной статистики, что закономерно для страны, погрузившейся в гражданскую войну. Ее ведение на территории советской России выглядит более удовлетворительным, чем на территории белых анклавов.

В статье осуществлен обзор ряда дискуссионных вопросов в отношении места и времени появления возбудителя испанки, специфики движения пандемии, симптоматики, уровня заболеваемости и смертности. На основе архивного материала (земской врачебной отчетности тех районов, где она уцелела; данных Народного комиссариата здравоохранения РСФСР, периодической печати и документов личного происхождения) прослежено движение пандемии в России.

Вирус испанки попал в страну через демаркационную линию с австро-германскими войсками на западной временной границе, определенной Брестским миром, в конце августа 1918 г. В начале сентября он был занесен через северные порты Мурманск и Архангельск интервенционными войсками союзников по Антанте. В европейской части страны вспышка пандемического гриппа датируется сентябрем–ноябрем 1918 г. Явных признаков появления пандемии в Сибири и на Дальнем Востоке пока не обнаружено. В эпидемии, подорвавшей боеспособность 11-й Красной армии осенью 1918 г., выявлен вирусный фактор. Нет оснований считать пандемию в России сопровождающейся высокой смертностью, кроме отдельных локальных очагов, связанных с военно-политической ситуацией.

Выдвинута версия о том, что нетипичный злокачественный характер сыпного и возвратного тифов, эпидемии которых начались осенью 1918 г., связан с предшествующим воздействием на популяцию вируса гриппа А/Н1N1 1918. Возможна связь между распространением малярии и кори в России в предшествующие пандемии годы и восприимчивостью к вирусу.

Ключевые слова: история пандемии испанки; вирус А/Н1N1 1918; Гражданская война в России; медико-санитарная статистика.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-00-00814 (18-00-00813) «Патриархальный мир и факторы жизнестойкости населения в период «долгой войны» 1914–1922 годов».

Для цитирования: Морозова О.М., Трошина Т.И., Морозова Е.Н., Морозов А.Н. Пандемия испанки 1918 года в России. Вопросы сто лет спустя. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021; 98(1): 113–124.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-98>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-62>

The Spanish flu pandemic in 1918 in Russia. Questions a hundred years later

Olga M. Morozova^{1✉}, Tatiana I. Troshina^{2,3}, Elena N. Morozova⁴, Aleksandr N. Morozov⁵

¹Don State Technical University, 344000, Rostov-on-Don, Russia;

²Northern (Arctic) Federal University named after M.V. Lomonosov, 163002, Arkhangelsk, Russia;

³Northern State Medical University, 163000, Arkhangelsk, Russia;

⁴Elmbrook Memorial Hospital, 53045, Brookfield, WI, USA;

⁵Clinical and Diagnostic Center "Zdorov'e" of the city of Rostov-on-Don, 344011, Rostov-on-Don, Russia

The course of the Spanish flu on the territory of the former Russian Empire is not well studied. This is due to the state of the medical statistics during the times of the Civil War. The medical data was collected more diligently by the Soviet Russia rather than by the officials of the White Army.

This article discusses the timeline, symptoms, morbidity and mortality of the Spanish flu. The materials used in this article were obtained from the regional hospital archives, printed publications, and personal memoirs.

The virus of the Spanish flu has initially entered the territory of Russia at the end of August of 1918 through the demarcation line with the German army at the temporary western border defined by the Treaty of Brest. In the beginning of September the virus was carried out by the Allies army through the ports of Murmansk and Arkhangelsk. In the European part of Russia, the outbreak started around September–November of 1918. So far, there is not enough data regarding pandemic flu in Siberia and Far East region of Russia. The unknown illness that undermined the combat capability of the 11th Red Army at the end of the fall of 1918 was likely of viral etiology. There was no evidence found that pandemic flu in Russia had high mortality.

The possible correlation between atypical malignant nature of typhus and relapsing fever, the epidemics of which began in the fall of 1918, and the previous exposure of the population to the influenza virus has been hypothesized. Another hypothesis under discussion is about the possible correlation between outbreaks of the malaria and measles and subsequent susceptibility to the pandemic Spanish flu virus.

Keywords: *history of the Spanish flu pandemic; influenza A/H1N1 virus; Russian Civil War; medical statistics.*

Funding. This work was financially supported by the RFBR (project No. 18-00-00814 (18-00-00813) "The patriarchal world and factors of the people's resilience during 'the Long War' of 1914–1922", 2019–2020).

For citation: Morozova O.M., Troshina T.I., Morozova E.N., Morozov A.N. The Spanish flu pandemic in 1918 in Russia. Questions a hundred years later. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(1):113–124

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-98>

Введение

Внимание к теме испанки и ее течения в России вызывают не только актуальные поводы, но и большой перечень пустот в познании этого события. На время пандемии приходится пробел в сведениях отечественной медицинской статистики, связанный с развалом государственного механизма, что было отмечено в коллективной статье, содержащей обобщенные эпидемиолого-статистические данные [1]. Отечественные исследователи, характеризуя распространение вируса в 1918–1919 гг., опирались в основном на документы Народного комиссариата здравоохранения РСФСР, который не мог иметь полную эпидемиологическую картину при наличии, помимо советского центра, изолированных красных и белых анклавов [2, 3]. Попытка реконструировать отсутствующие данные была предпринята в статье «Грипп» первого издания Большой медицинской энциклопедии, когда за счет экстраполяции данных по Москве и Петрограду была получена примерная цифра погибших от испанки [4]. Наряду с дефицитом достоверной статистики о заболевших и умерших отсутствует представление о движении эпидемии испанки по России. В то же время большие результаты достигнуты в изучении борьбы против эпидемий и массовых заболеваний в первые годы советской власти в контексте становления отечественной системы здравоохранения. В числе таких исследований монографии О.В. Барояна, П.Н. Бургасова, К.Г. Васильева, А.Е. Сегала [5–8]. Интерес вирусологов, иммунологов и эпидемиологов к пандемии 1918 г. не ослабевает, по-

скольку она представляется примером классической пандемии, показав сочетание возбудителя с неизвестными свойствами, высокую вирулентность, несколько волн распространения и нетипичный механизм поражения популяции.

Источники

Наиболее полная медицинская статистика по пандемии существует в странах, не затронутых боевыми действиями, — США, Канаде и Австралии, что и позволило исследователям всесторонне изучить клиническую картину заболевания и параметры пострадавших. Во многих других странах документальное освещение пандемии испанки ограничено. В нашей стране этому мешала Гражданская война. Движение эпидемии по территориям, находившимся под контролем большевиков, частично отражено в материалах Наркомата здравоохранения. В белых анклавах отсутствовала единая система учета. Там, по традиции, сформировавшейся в годы Первой мировой войны, наряду с армейскими военно-санитарными структурами существовали структуры, принадлежавшие Союзам земств и городов, подотчетные командованию лишь формально.

Дискуссионные вопросы пандемии испанки

Подавляющее большинство ученых сходятся в том, что Испания ошибочно связывается с появлением нового штамма вируса гриппа. Версий локализации первичного очага инфекции как минимум три, и если иметь в виду предполагаемое место ге-

нерации вируса, то это североамериканская, франко-британская и китайская.

Североамериканская версия. Этот тезис развивается исследователями из США. Альфред В. Кросби утверждает, что один из первых зарегистрированных случаев произошел 11.03.1918 г. в форте Райли в Канзасе [9]. По другим данным, «нулевой пациент» — это повар А. Гитчел в лагере Фанстон в Канзасе, который 04.03.1918 г. начал страдать от кашля, лихорадки и головной боли [10]. Попав в Европу вместе с военнослужащими армии США, вирус быстро распространился, с равной силой поразив армии Антанты и Четверного союза.

Франко-британская версия. Признаки зарождения эпидемии среди солдат военной базы Этапль, на побережье Северной Франции, были обнаружены британскими учеными [11, 12].

Китайская версия. Сравнительно новая теория канадских и американских авторов о происхождении вируса предполагает, что он, так или иначе, восходит к китайскому вирусному резервуару [13, 14]. Дальнейшее распространение вируса связано с перевозкой 90 тыс. китайских рабочих в Европу зимой 1917–1918 гг. [10, 12, 15–17]. Исходя из этой версии, Россия имела все возможности получить возбудителя испанки из Китая, но этого не случилось. Не поддерживая этот подход, китайские исследователи утверждают, что испанка была завезенной инфекцией и ранее мая 1918 г. в Китае не регистрировалась [18].

Нет общего подхода в отношении времени появления вируса А/Н1N1 1918. Но раньше 1916 г. искать истоки пандемии большинство исследователей не решаются. Кроме того, генетический анализ вируса 1918 г. указывает на происхождение вируса около 1915 г. [19, 20].

Первая волна пандемии испанки показала высокую контагиозность. Уровень смертности был немного выше, чем средний для весеннего времени. Инфекция охватила страны Антанты, затем нейтральные государства и державы Четверного союза [10, 16]. Вторая волна испанского гриппа, начавшись летом, захлестнула мир осенью 1918 г. Как и первая, она имела широкое и быстрое распространение, но дала, в отличие от нее, высокую смертность. Часто, говоря о пандемии 1918 г., точнее о ее второй волне, упоминают шокирующие цифры — 500 млн инфицированных (треть населения тогдашнего мира) и 50–100 млн умерших. Однако это не соответствует уровню летальности, который указывается в специальной литературе: около 2,5%, но это все равно более чем в 25 раз выше, чем при любой другой вспышке гриппа [21]. Начиная с августа отмечались пневмония с сильным удушьем, цианоз с пятнами цвета красного дерева такой интенсивности, что «трудно бывает отличить цветных мужчин от белых» [10]. Очевидцы повсеместно от-

мечают этот характерный симптом. При сортировке поступающих больных медсестры часто сначала смотрели на цвет ног пациентов.

К декабрю 1918 г. большая часть северного полушария была уже свободна от пандемического гриппа, но в это время эпидемия пришла в южное полушарие. Австралийским летом 1918–1919 гг. более 12 тыс. человек погибло от третьей волны гриппа, занесенного солдатами, демобилизованными после окончания Первой мировой войны. В последнюю неделю января 1919 г. третья волна вернулась в северное полушарие. Часть авторов склоняются к тому, что уровень смертности был таким же высоким, как и во время второй волны. В мае 1919 г. эта третья пандемия была объявлена завершенной [12, 21].

Вопрос о причинах роста смертности во вторую волну является одним из ключевых для пандемии 1918 г. Существующие версии условно можно разделить на гипотезы о двух типах вируса и о роли вторичной инфекции. После открытия вируса как возбудителя гриппа и его способности к мутации развивалась версия о трансформации вируса в сторону большей вирулентности под влиянием различных факторов. Исследования полученных образцов тканей жертв пандемии обнаружили такие мутации [22]. Ей противостоит позиция, которая отводит главную роль в повышении смертности во время второй волны вторичной бактериальной инфекции дыхательных путей. При этом сторонники данной версии не отрицают мутации вируса. На основе медицинских карт австралийских военнослужащих, находившихся в 1918 г. в Европе и на Ближнем Востоке, они утверждают, что люди, пострадавшие во время первой волны, с такой же вероятностью могли заболеть, но с гораздо меньшей вероятностью — умереть от пневмонии во время второй волны. Защита была обеспечена нейтрализующими антителами против таких же или сходных антигенов вирусной поверхности [15, 23–28].

Уникальной характеристикой «испанского» гриппа является беспрецедентный уровень смертности среди лиц в возрасте 20–40 лет. D.M. Mogens и соавт. [22] объясняют «W» смертности по возрастным группам тем, что, возможно, антигенно подобный испанке штамм гриппа циркулировал до 1889 г., обеспечивая защиту от нового пандемического штамма А/Н1N1 тем, кто родился до 1889 г. и пережил эпидемию гриппа 1847 г. «Русский» вирус (он может идентифицироваться как Н3NХ или как Н2N2) мог появиться примерно в 1889 г. и циркулировать до 1918 г., оставляя тех, кто не подвергся воздействию менее распространенного в начале XX в. вируса подтипа Н1, очень восприимчивыми к пандемическому вирусу. В современной популяции пожилые группы также могут давать низкий процент восприимчивости к определенному вирусу гриппа. Исследования 2000-х гг. выявили способ-

ность нейтрализующих антител сохраняться в крови выживших в пандемии 1918 г. даже через 90 лет [29]. G.D. Shanks и соавт. [24] считают роль иммунного «опыта» более сложной. По их мнению, высокая смертность могла быть связана с предшествующей встречей организма с гетеросубтипическими штаммами гриппа, что искажало иммунный ответ при заражении пандемическим гриппом 1918 г. в контексте специфических антител против бактериальных штаммов.

Испанка в России

По статистике Наркомата здравоохранения РСФСР, развитие пандемии в России происходило синхронно с общемировыми процессами. В статистической сводке по Москве за 1918 г. определяются две волны: март–июнь и октябрь–ноябрь. Случаи крупозной пневмонии, которые почти всегда превосходили по численности диагностированную инфлюэнцу, тоже были увязаны с возбудителем испанки [30]. Как следует из материала [30], в Москве весенняя вспышка инфлюэнцы проявилась одновременно со случаями в фортах Райли и Фанстон. Документы других регионов не показывают первую — весенне-летнюю — волну пандемии. Не исключено, что дело в том, что в России в это время происходили куда более существенные трансформационные процессы, чем пандемия и даже мировая война. Но вторую — осеннюю — волну не увидеть было невозможно.

Первые сообщения на территории бывшей Российской империи относятся к сентябрю 1918 г. (к концу августа по старому стилю). Испанка могла прийти в центральную Россию из Австрии и Германии. Немецкие авторы относят начало второй волны в Германии к сентябрю, а пик — к периоду с середины октября до начала ноября [31]. Опять удивительная синхронность вспышек. В сентябре в оккупированном Киеве горожане уже массово заболели испанкой и многие умирали! Всего было зарегистрировано до 700 тыс. заболевших, т.е. почти все население города; смертность составила 1,5% [3].

На примыкающей советской территории, отделенной от оккупационной зоны демаркационной линией, испанка появилась в конце лета 1918 г. В последние дни августа мобилизационный отдел 1-й Красной армии в Саранске столкнулся со вспышкой неизвестной болезни среди мобилизуемых. Местные врачи диагностировали тиф. Но назначенный на должность врач отдела Агарев обратился за помощью в Общество врачей при Московском и Казанском университетах и выявил испанский грипп [32]. Степень вирулент-

ности этой инфекции неясна. В газетном сообщении, датированном октябрём, говорится о тяжёлом течении заболевания и о высокой смертности в Курской и Воронежской губерниях². Оказались поражёнными испанкой, хотя и в разной степени, губернии, непосредственно примыкавшие к линии разграничения (Смоленская — 77,3 тыс. заболевших в 1918–1919 гг., Орловская — 73,4 тыс., Псковская — 66 тыс., Калужская — 40,8 тыс., Курская — 31,6 тыс., Воронежская — 27,6 тыс., Витебская — 20 тыс., Новгородская — 20,5 тыс.) и расположенные на основных транзитных путях: Владимирская — 89,7 тыс. (6% населения), Тамбовская — 76,4 тыс., Нижегородская — 51,2 тыс., Костромская — 39,4 тыс. Эти показатели объяснимы, но, как в случае со многими эпидемиями, испанка дала и несколько «аномалий». «Тупиковая» Вятская губерния оказалась среди лидеров — 82,7 тыс. случаев, или 4% населения. Московская губерния, являвшаяся крупнейшим транспортным перекрестком страны, имела средний уровень заболеваемости (30,6 тыс., или 1,25%). Столичная Петроградская губерния была поражена меньше по сравнению с другими (13,4 тыс., или 0,6%) [33]. Таблица А.Н. Перуанского, из которой взяты эти цифры, не может дать полную картину эпидемии. По-видимому, автор руководствовался отчётными документами, которые с территорий, занятых противником, не поступали. Как следует из таблицы, в Архангельской губернии было всего 104 случая, что противоречит известным фактам.

В начале октября 1918 г. инфлюэнца стала подлинным бедствием на Дону. В приказе атамана Всевеликого войска Донского П.Н. Краснова от 27 октября (9 ноября) 1918 г. говорилось, что начавшаяся эпидемия испанки сопровождается паническими и провокационными слухами: «Вследствие отсутствия газет, плохой работы почты агитаторы всякого рода, “бесы тёмной породы” сеют самые нелепые слухи. ... Говорили, что испанская болезнь прислана к нам немцами, которые распространяют ее через сахар»³.

Объехавший в октябре 1918 г. станции Черкасского округа генерал-майор С.С. Попов докладывал атаману: «Положительно во всех станицах и хуторах наблюдаются повальные заболевания испанкою с большой смертностью. Почти в каждом дворе есть больной, а некоторые семьи повально больны, и все хозяйство, как-то: скот, птица и проч[ее], находятся под призрением сердобольных соседей, у кого такие есть. В станице Бессергеновской мне было заявлено, что были случаи вымирания целых семей, и тела находились в домах больше, чем возможно, и

¹ Государственный архив Ростовской области. Ф. 841. Оп. 1. Д. 3. Л. 81–81 об.

² Газета «Курская беднота». 1918. 10 окт.

³ Государственный архив Ростовской области. Ф. 858. Оп. 1. Д. 22. Л. 258–258 об.

предавались земле соседями или обществом. Многие хутора и даже станицы, отдаленные от центра, крайне ограничены медицинской помощью, так наприм[ер], некоторые станицы (Хомутовская), не говоря о хуторах, не имеют даже фельдшеров, а где есть, то один, и в редких случаях — два, которые совершенно бессильны при настоящей эпидемии»⁴. В связи с создавшейся ситуацией атаман отменил объявленную ранее мобилизацию в армию земских, станичных, волостных врачей и фельдшеров и приказал подготовить особые летучие отряды, снабдив медикаментами⁵.

В Царицынской губернии испанка появилась в октябре 1918 г., преодолев фронт, разделявший Донскую армию и обороняющих «красный Царицын».

Испанка была причастна и к драматической судьбе 11-й Красной армии, воевавшей на Северокавказском фронте. Инфекцию, поразившую её осенью 1918 г., обычно именуют сыпным тифом. Так она проходит и в официальных документах, и в воспоминаниях современников. Но в пространных мемуарах бывшего командира 1-го Черноморского революционного отряда А.В. Мокроусова⁶ четко различаются испанка и тиф, указываются даты, когда появилась та или иная болезнь, дается описание заболевших, позволяющее хотя бы предположительно верифицировать инфекционное поражение. Отступающие с территории Дона и Кубани части Красной армии встретились с испанкой в октябре 1918 г., когда они находились в районе Минеральные Воды — Георгиевск — Святой Крест. Наряду с ней набирал силы и сыпной тиф, который вскоре «вытеснил» испанку.

А.В. Мокроусов не был лишен литературных наклонностей, а потому отрывок из его мемуаров стоит привести: «К началу ноября Георгиевская больница была переполнена ранеными; того больничного уюта, что был в первые дни моего туда приезда, не стало, не хватало медикаментов, перевязочного материала, коек и белья. Продовольствие доставалось с трудом. Прежних веселых откормленных матросов-раненых сменили худые грязные с изможденными лицами, ко всему этому прибавилась испанка, люди чернели и умирали. <...> Однажды я пошел проводить на кладбище своего старого товарища морячка Волошина, умершего от испанки... Когда мы вышли за город, то увидели десятки рабочих, копавших землю. <...> Это рылись ямы для революционеров, сотнями гибнущих от тифа, испанки и ран. Размеры выкапываемых ям по своей величине были похожи на морской канал,

ширина их была рассчитана на два человеческих роста, глубина — сажени две и сажень 30–40 длины. Привозимых мертвецов складывали в ряд голова к голове, засыпали небольшим слоем земли и ждали следующих. Могильщики были разбиты на две группы: одна из коих копала все новые и новые ямы, другая — засыпала мертвецов»⁷.

А.В. Мокроусов указал важную деталь, что «люди чернели и умирали», симптом цитокинового шторма. Сам Мокроусов, только дойдя до Астрахани, заболел сыпным тифом. Встает вопрос, почему 31-летнего моряка испанка обошла стороной. Возможно, ответ в его биографии. За пять лет политической эмиграции (1912–1917 гг.) он объездил много стран и континентов: Швецию, Данию, Англию, Австралию, Аргентину. Океаны он пересекал в качестве судового кочегара или пассажира третьего класса. В таких условиях он не мог избежать соприкосновения с разнообразными патогенами и, по-видимому, сформировал поливалентный иммунитет, защитивший его при встрече с вирусом А/Н1N1 1918.

Второй путь переноса в Россию вируса испанки проходил через северные порты — Мурманск и Архангельск. В Северной армии генерала Е.К. Миллера и среди населения Архангельской губернии в 1918–1919 гг. почти безраздельно господствовала испанка. Ее завезли военнотруженики интервенционных войск: американцы, англичане, французы. В первой половине августа 1918 г. из Бостона вышел пароход «Nagoya», который должен был доставить в Архангельск 339-й пехотный полк армии США. Первые заболевшие появились, еще когда пароход был в океане. 5 сентября 1918 г. полк высадился в порту Архангельска. Рядовой, выдвинувшийся на фронт с красными подразделениями, К.Г. Шой писал 10 сентября в дневнике: «Смерть, кажется, начинает входить во вкус и привычку. Сегодня скорпостижно умер еще один солдат из нашей роты. Последовали короткие похороны в ближайшей деревне. Не-да, не очень-то оптимистичное начало для нашего небольшого войска, прореженного гриппом, — 36 человек роты “В” были оставлены больными в Архангельске. И смертельная хворь цепко тянется за нами, помечая могилами несчастных чужие берега» [34]. Но затем испанка отпустила американских солдат, в течение всей зимы их регулярно посещали лишь кишечные расстройства в связи с однообразной пищей и сырой водой.

Вирус перекинулся на местное население. 10 октября 1918 г. правительство Северной области учредило при врачебном инспекторе комиссию по борьбе с инфлюэнцей⁸. В Кемском уезде инфлюэнца

⁴ Государственный архив Ростовской области. Ф. 46. Оп. 1. Д. 4205. Л. 92.

⁵ Государственный архив Ростовской области. Ф. 858. Оп. 1. Д. 22. Л. 260–260 об.

⁶ Центр документации новейшей истории Ростовской области. Ф. Р-12. Оп. 2. Д. 264. Л. 54.

⁷ Центр документации новейшей истории Ростовской области. Ф. Р-12. Оп. 2. Д. 264. Л. 54.

⁸ Сборник узаконений Верховного управления Северной

составила 19,5% (3784 человека) от всех случаев заболеваний в сентябре–ноябре. В Шенкурском уезде было зарегистрировано 5130 случаев гриппа, тяжёлых 61, умерло 5; пневмония — 191 больной, тяжёлых 14, умерло 3⁹. При отсутствии унифицированной статистики выводы о смертности затруднены, но очевидно, что она не была экстремально высокой.

В начале октября 1918 г. грипп появился в Холмогорском уезде Архангельской губернии, сначала в селе Тарасовском, которое считалось белым, потому что ориентировалось на Архангельск, на командование Северной армии генерала Миллера. Потом инфекция перекинулась в соседнее село Церковное, с которым тарасовцы образовали фронт и вели бои, ведь там были «большевики». Из-за эпидемии испанки были остановлены военные действия между селами, поскольку противники лежали по домам. Кое-кто укрывался на лесных заимках. В Тарасовском умерло 60 человек, были умершие и в Церковном, а потом эпидемия сама собой прекратилась, и бои возобновились¹⁰. Шестьдесят человек — это 3% от менее чем двухтысячного населения волости, что соответствует среднемировым показателям.

Доктор Барминский, служивший в перевязочном госпитале 1-й бригады 18-й стрелковой дивизии РККА, отмечал, что зимой 1918/1919 гг. было много больных испанкой [35].

Грипп не мог не передаваться на другую сторону фронта. Этому способствовали отсутствие сплошной линии фронта, контакты в «нейтральных» деревнях «беляков» и «красиков», активный обмен товарами между жителями прифронтовых селений. По воспоминаниям бывших членов красных партизанских отрядов, заболеваемость была поголовная, от нее потери были больше, чем в боях¹¹.

Как свидетельствует доклад Северного областного комитета РКП(б), направленный в Совнарком Северной области в декабре 1918 г., на контролируемой им территории Архангельской губернии господствовали эпидемия испанки и голод: «... Громадное большинство деревенской бедноты голодает. <...> ...Население уже умирает — вы очень часто можете встретить картину — у деревенской церкви на улице поставлены в кучу 10–15 гробов умерших от испанки. Белогвардейский поп убежал, а темное население ждет, когда придет “батюшка”

области. 1918. 10 окт.

⁹ Государственный архив Архангельской области. Ф. 236. Оп. 1. Д. 1595. Л. 36, 46, 54–57, 65–72, 81 об., 90–95.

¹⁰ Государственный архив Архангельской области. Ф. 780. Оп. Д. 8. Л. 122; Государственный архив Архангельской области. Отдел документации социально-политической истории. Ф. 8660. Оп. 3. Д. 696. Л. 3 об.

¹¹ Государственный архив Архангельской области. Отдел документов социально-политической истории. Ф. 8660. Оп. 3. Д. 293; Государственный архив Архангельской области. Отдел документов социально-политической истории. Ф. 8660. Оп. 3. Д. 161.

и отпоет покойничков»¹². В одной из волостей Пинежского уезда — Поганецкой — с 21 октября по 9 ноября заболело 468 человек, умерло 68. К белым убежал не только поп, но и почти все уездные медики. Остался один врач и два фельдшера, которые четыре месяца не получали жалования.

Если к январю 1919 г. на Юге эпидемия испанки прекратилась, то на Севере она давала о себе знать до весны. Осенью 1919 г. испанка вернулась — если на Юге довольно незначительными проявлениями, то в северных губерниях более серьезными, но лишенными признаков пандемического гриппа. В Онежском уезде заболело менее 2% населения, а смертность от гриппа составила 1,0%, от пневмонии — 2,4%. В Шенкурском уезде заболевших гриппом было около 1,1%. О смертности сведений нет, что показательно. Среди военнослужащих, прошедших зимой 1919/1920 гг. через лазарет Северной армии на станции Обозёрская, в 100 верстах южнее Архангельска, больные с диагнозом «инфлюэнция» составляли более трети пациентов (34,2%). Более 60% из них после нескольких дней пребывания под наблюдением выписывались в часть. Среди умерших в лазарете числился только один больной, которого в течение 10 дней лечили от пневмонии, но после смерти диагноз исправили на тиф¹³.

28 декабря 1919 г. командированный врач Матвеев сообщал начальнику Пинежского уезда о результатах своего обследования, что повальной болезнью, внезапно возникающей и быстро распространяющейся, оказалась инфлюэнца. В деревне Юрولا им обнаружено четыре неблагополучных дома. Но умерших не было. Не было и медиков. На уезд остался один фельдшер, остальные были мобилизованы в Северную армию¹⁴.

В эти же дни и на советской стороне медики устанавливали природу разыгравшейся эпидемии. Этому было посвящено заседание Научного совещания военных и красно-крестных врачей г. Вологды 16.12.1919 г. Отмечалось, что чаще всего болезнь проявляется в форме гриппозной пневмонии, причем воспалительные фокусы чаще всего гнездятся в нижних долях легкого. Болезнь также проявляется в форме различных расстройств то со стороны желудочно-кишечного тракта, то с преобладанием явлений со стороны нервной системы, то поражаются по преимуществу суставы. Вновь было отмечено, что заболевают главным образом люди «цветущего» возраста, поэтому так много больных среди красноармейцев. Врачи обсуждали вопрос о связи

¹² Российский государственный архив социально-политической истории. Ф. 67. Оп. 1. Д. 25. Л. 13–16.

¹³ Российский государственный военный архив. Ф. 40033. Оп. 1. Д. 13. Л. 26.

¹⁴ Государственный архив Архангельской области. Ф. 236. Оп. 1. Д. 1595. Л. 73, 86, 102, 210.

диагноза гриппа и обнаружения палочки Пфейфера в мокроте. Докладчик доктор Розов отмечал легкость получения вторичных заболеваний после только что перенесенной испанки [36]. В зиму 1919/1920 гг. в одной из больниц Пермской губернии испанка дала 35% смертности у больных с этим диагнозом, хотя таких пациентов было немного. Врачи связывали это с общим ослаблением организма из-за недоедания и ухудшения бытовых условий¹⁵.

В Архангельской губернии разносу инфекции способствовали перемещение линии фронта и передвижения военных обозов и армейских частей. По данным советской статистики, зарегистрированная смертность от инфлюэнцы составляла около 2%¹⁶. Она так же, как и в прошлый сезон, захватывала самый зрелый возраст, от 20 до 40 лет. Зараженные были не только в отдаленных деревнях, но и в тундре среди ненцев. Затем она так же, как и на Юге, была «вытеснена» сыпным тифом [37].

Территории, по которым имеются сведения, показывают разный уровень заболеваемости и смертности, что может быть связано и с отсутствием общих требований к формированию статистики, и с низкой квалификацией больничных служащих, готовивших отчетность. На это могли повлиять и социальные факторы — различная вовлеченность в миграционные процессы. На основе американской статистики установлено, что у жителей сельских районов был низкий уровень смертности, связанной с пандемией, т.к. они относительно редко подвергались бактериальным инфекциям, сопровождавшим вирусное заболевание. Напротив, военнослужащие, выходящие из тех же сельских районов, находясь в армейской среде среди новых бактериальных инфекций, подвергались одновременному заражению новыми для них штаммами бактерий и вирусами, и у них был относительно высокий уровень смертности, связанной с пандемией [38].

В отличие от распространенного мнения, сельское население России было достаточно мобильным. В пореформенное время широко развился отхожий промысел. Целые губернии считались отходническими: Архангельская, Олонецкая, Тамбовская, Ярославская. Столыпинская реформа вовлекла в активный миграционный процесс и зауральские земли. Во многих крупных городах империи работали международные бюро по найму рабочей силы, поэтому обремененный долгами крестьянин-осетин из горной Дигории имел возможность отправиться на заработки в Харбин или в Аргентину.

Из нашей палитры выпадает такая огромная часть России, как Сибирь. По утверждению ита-

льянских авторов М. Martini и соавт., из России эпидемия распространилась по всей Северной Азии, пришла в сентябре 1918 г. в Индию, а в октябре — в Китай [39]. Но следы испанки в Сибири найти не просто, несмотря на присутствие там интервенционных войск США, Британии, Канады, Японии, Италии. Современники и исследователи указывают на главную эпидемию в регионе — сыпной тиф. Исследователи, специально интересовавшиеся эпидемической картиной Сибири 1918–1919 гг., не сталкивались со случаями пандемического гриппа [40]. И лишь недавно обнаруженный в Токио архив гарнизонной больницы 5-й японской армии, располагавшейся с марта 1919 г. по апрель 1920 г. в Красноярске, помог вписать в историю испанки сибирскую страницу. Все 132 случая приходились на пехотинцев в возрасте 19–49 лет (средний возраст 22,7 года). Уровень смертности составил 6,0%, самый высокий был в группе от 20 до 30 лет. Медицинские записи показывают, что солдаты жили в казармах, не имея контактов с жителями города. Большинство случаев клинического гриппа в красноярском госпитале относятся к маю–ноябрю 1919 г. По-видимому, инфекция пришла в гарнизон непосредственно из Японии, где с ноября 1918 г. росло число стационарных больных гриппом [41].

Но на этом феномены Сибири не заканчиваются. Тот самый W-образный график смертности от испанки по возрастам можно обнаружить в регионе и без поражения пандемическим гриппом. Материалы санитарной статистики г. Томска показывают отчетливую дифференциацию смертности по половозрастным группам. На долю мужчин в общей совокупности умерших приходилось свыше 81%, что почти в 4 раза выше показателей смертности среди женщин. При этом вымиранию были подвержены главным образом молодые мужчины. Эта возрастная группа оказалась самой «слабой» и наименее устойчивой к негативному влиянию факторов внешней среды. Смертность 18-летнего возраста достигала 345% (женщин — 19%), 19-летнего — 751% (женщин — 15%). Смертность мужчин возрастной группы 20–24 года составляла 428% (женщин — 17%) [42]. Таким образом, не только вирусная инфекция могла давать эффект поражения молодых и физически сильных организмов. Вопрос о причинах этого явления остается открытым.

Кроме того, в связи с отсутствием явных признаков распространения испанки в Сибири можно оценить шансы на истинность гипотезы о китайском очаге пандемии испанки. Дело в том, что контакты российских территорий с Китаем были активными всегда. В предвоенные годы китайцы и корейцы работали в Сибири на приисках и строительстве железных дорог. За годы Первой мировой войны в Россию было ввезено около 60 тыс. китайских рабочих. С 1916 г. царское правительство разрешило

¹⁵ Государственный архив Свердловской области. Ф. Р-47. Оп. 1. Д. 13. Л. 245 об. 247.

¹⁶ Государственный архив Архангельской области. Ф. 236. Оп. 1. Д. 1273. Л. 20–24, 27, 31, 50.

их широкое использование в Европейской части России. Они работали на предприятиях Москвы, Петрограда, Харькова, Донбасса, на строительстве Черноморской и Мурманской железных дорог [43]. В ходе боёв Гражданской войны регулярно совершались трансграничные переходы крупных вооруженных формирований. Так, в мае 1918 г. отряды атамана Г.М. Семёнова были вытеснены в Китай, откуда совершали вылазки на советскую территорию до августа, когда вернулись в Россию, имея в своем составе пехотные полки из китайцев. Не прекращалась трудовая миграция китайских крестьян на территорию Забайкалья и Приморья. Так была занесена летом 1920 г. азиатская холера, но не испанка в 1918 г.

В европейской части России после прекращения боевых действий против Русской армии П.Н. Врангеля эпидемическая обстановка на пространстве недавних боевых действий не пришла в норму, но в известном смысле успокоилась. В дальнейшем грипп традиционно регистрировался на территории СССР. Уровень заболеваемости сильно различался по годам и регионам. Но даже в годы «вспышек» отмечалось, что болезнь не имеет такого грозного характера, как испанка. В 1920-х гг. заболеваемость гриппом регистрировалась на уровне 1,5–2,4%¹⁷.

Коинфекции: испанка и другие эпидемии

В России в годы Гражданской войны пересеклись пути нескольких инфекционных патогенов. Замечание американского русиста, что в России «многие не успевали оправиться от одной болезни, как наступала другая» [44], отражает жестокую реальность 1918–1919 гг.

Медикам известно, что обстоятельства «встречи» в организме человека сразу нескольких вирусных и бактериальных инфекций влияют на исход его болезни. Исследования на животных подтвердили, что опосредованные Т-клетками иммунопатологические реакции могут способствовать тяжелому пневмониту, когда организм подвергается воздействию высокогликозилированного вируса гриппа и впоследствии заражается низкогликозилированным штаммом. Замечено, что заражение вирусом сезонного гриппа H1N1 с последующим инфицированием вирусом пандемического гриппа H1N1 2009 вызывало серьезные иммунопатогенные реакции. Инфицирование пневмококком после заражения вирусом гриппа, но не раньше (!), приводило к развитию вторичной летальной пневмонии и других инвазивных осложнений [24].

Существуют обоснованные гипотезы о влиянии эпидемии кори 1916–1917 гг. на восприимчивость к новому вирусу гриппа 1918 г. Недавние

исследования показали, что вирус кори поражает Т-лимфоциты памяти, что приводит к апоптозу и продолжительному подавлению иммунитета — до 3 лет после первоначального инфицирования корью [45]. Получены статистически значимые данные о высокой уязвимости к вирусу гриппа больных туберкулезом, что рассматривается как одна из причин высокой заболеваемости и смертности среди молодых людей в пандемии гриппа 1918 г. [46]. Также установлено, что смертность во время пандемии испанки была значительно выше среди инфицированных малярией. Хотя основной механизм полностью не понят, прокоагулянтное состояние, вызванное малярией, может играть роль в усилении воспаления и последующем летальном исходе [47, 48].

По поводу российских реалий важно отметить, что естественными резервуарами малярии являлись южные районы страны: влажные леса Причерноморья, плавни Кубани, камышовые заросли Кумы. В XIX в. возвращавшиеся после службы на Кавказской линии казаки, солдаты и офицеры нередко страдали «трехдневной лихорадкой», чем способствовали ее выносу за ареал обычного распространения. В северные губернии невиданную здесь прежде малярию завезли солдаты Первой мировой войны¹⁸.

Возникает вопрос, не связана ли с этими фактами география пандемии испанки в России. В 1920-е гг. в Военно-санитарное управление РККА представлялись санитарно-медицинские отчеты по отдельным мобилизационным округам. Как пораженные малярией отмечены следующие губернии: Владимирская, Курская, Нижегородская, Орловская¹⁹, которые значатся в таблице А. Перуанского среди давших наибольшее число заболевших испанкой.

Испанка не имела исключительного положения среди инфекций, которыми были поражены в эти годы жители России. Статистика по испанке терялась среди других инфекционных поражений. В конце сентября 1918 г. в Курской и Воронежской губерниях вспыхнула эпидемия азиатской холеры, занесенной мешочниками с юга. И в эти месяцы смертность от холеры превышала смертность от испанки: в Курской губернии — 41,5%²⁰. Справиться с ней удалось благодаря большим запасам вакцины, заготовленным еще до революции [49].

Сыпной тиф приобрел осенью 1918 г. чрезвычайно летальный характер, не типичный для него в предыдущие годы. За 20 лет с 1892 по 1913 г. коэффициент заболеваемости сыпным тифом в России

¹⁸ Государственный архив Архангельской области. Ф. 236. Оп. 1. Д. 28. Л. 75, 108.

¹⁹ Российский государственный военный архив. Ф. 34. Оп. 4. Д. 8. Л. 16–18, 177, 198 об. 199 об., 220.

²⁰ Государственный архив Белгородской области. Ф. Р-696. Оп. 1. Д. 10. Л. 328–330.

¹⁷ Российский государственный военный архив. Ф. 34. Оп. 4. Д. 8. Л. 180 об., 200, 222.

колебался от минимума (2,8 на 10 тыс. населения) до максимума — 15,5 на 10 тыс. человек (в 1892 г.). Средним считался показатель 7,3 на 10 тыс. человек, как в 1913 г.²¹ Летальность в мирное время составляла около 1%. Во время Первой мировой войны в полевых условиях, особенно на Кавказском фронте и в Туркестане — в районах, которые являются природными очагами ряда инфекционных болезней, заболеваемость сыпным тифом выросла в разы. Летальным исходом заканчивалось 3–4% случаев заболевания. Как показывают статистические сведения Военно-санитарного управления РККА, в 1919 г. заболеваемость сыпным и возвратным тифом в армии выросла в 10 000 (!) раз по сравнению с 1913 г.²², а смертность возросла в десятки раз, порой превосходя треть заболевших. И это при том, что до 1918 г. возвратный тиф встречался достаточно редко²³. Встает вопрос, каков эпидемиологический механизм такого замещения.

Заключение

В связи с особенностями географического положения и размерами Россия могла иметь не менее трех входных ворот для завозной инфекции: западные губернии, северные порты и Дальний Восток. Пока можно уверенно говорить о задействовании для распространения испанки двух путей. Действительно моровой характер испанка приобрела там, где имелось плотное взаимодействие с армиями Антанты и Четверного союза — на Русском Севере и на Юге, включая Украину. К сожалению, медицинская статистика этих регионов отсутствует, и мы можем руководствоваться только отдельными данными и свидетельствами современников. В то же время некоторые территории бывшей Российской империи не имели четкого эпидемического поражения испанкой. В Сибири, куда тоже были введены оккупационные войска стран, переживающих в тот момент эпидемию, ее признаки не обнаруживаются даже в крупных городах и на железнодорожных узлах. Точную географию распространения пандемии испанки в России еще предстоит установить.

Дошла ли в Россию первая волна пандемии, точно не известно, а вторая началась и утонула синхронно с общемировой динамикой. Третьей волны в России, по-видимому, не было. В сезон 1919–1920 гг. инфлюэнца уже не имела свойств пандемии.

Факт того, что в Европе и на Украине, Дону патоген второй — убийственной — волны появился одновременно, требует осмысления с позиции эпидемиологии. «Транспортировка» с помощью

коммуникаций военного времени не могла быть быстрой и массовой.

Об уровне летальности нет надежных статистических данных, поскольку система здравоохранения была разрушена в ходе политических событий. Сведениям отдельных лечебных учреждений трудно придавать глобальный характер. Но вместе с тем можно предположить, что течение инфлюэнцы, особенно в центральных губерниях, вероятно, не было крайне тяжёлым. Вывод доктора Л.А. Тарасевича о том, что «показатели заболеваемости и смертности от различных эпидемических заболеваний намного выше в России, чем в странах Западной Европы», и что страна оказалась в ситуации, подобной великим эпидемиям древности [49], касается тифозных инфекций, холеры, оспы, но не испанки.

Изученный материал подсказывает, что возможна связь между распространением малярии в предшествующие пандемии годы, а также можно предположить влияние испанки на приобретение сыпным и возвратным тифом особенно злокачественного течения в 1919–1920 гг.

Российская картина пандемии испанки 1918 г. может быть связана с пониманием обусловленности её свойств сложным взаимодействием факторов, присущих самому вирусу 1918 г., влиянием коинфекций, иммунным ответом хозяина и социальным контекстом, в котором разразилась пандемия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Затравкин С.Н., Хабриев Р.У., Щепин В.О., Саркисов А.С. Заболеваемость инфекционными болезнями в СССР. Сообщение 1. 1919–1949 годы. *Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины*. 2018; 26(5): 350–6. <https://doi.org/10.32687/0869-866X-2018-26-5-350-356>
2. Лотова Е.И., Идельник Х.И. *Борьба с инфекционными болезнями в СССР (1917–1967). Очерки истории*. М.: Медицина; 1967.
3. Супотницкий М.В. Пандемия «испанки» 1918–1920 гг. в контексте других гриппозных пандемий и «птичьего гриппа». *Медицинская картотека*. 2006; (11): 31–4. Available at: <http://www.supotnitskiy.ru/stat/stat51.htm#gl2>
4. Семашко Н.А., ред. *Большая медицинская энциклопедия*. Том 8. М.; 1929.
5. Бароян О.В. *Итоги полувековой борьбы с инфекциями в СССР и некоторые актуальные вопросы современной эпидемиологии*. М.: Медицина; 1968.
6. Бургасов П.Н. *Состояние и перспективы дальнейшего снижения инфекционной заболеваемости в СССР*. М.: Медицина; 1987.
7. Васильев К.Г., Сегал А.Е. *История эпидемий в России*. М.: Медгиз; 1960.
8. Васильев К.Г. *История эпидемий и борьба с ними в России в XX столетии*. М.: Медицина; 2001.
9. Crosby A.W. *America's Forgotten Pandemic: The Influenza of 1918*. Cambridge: University Press; 1989.
10. Wever P.C., van Bergen L. Death from 1918 pandemic influenza during the First World War: a perspective from personal and anecdotal evidence. *Influenza Other Respir. Viruses*. 2014; 8(5): 538–46. <https://doi.org/10.1111/irv.12267>
11. Oxford J.S., Lambkin R., Sefton A., Daniels R., Elliot A., Brown R., et al. A hypothesis: The conjunction of soldiers, gas, pigs, ducks, geese and horses in Northern France during

²¹ Российский государственный военный архив. Ф. 34. Оп. 4. Д. 9. Л. 200.

²² Российский государственный военный архив. Ф. 34. Оп. 3. Д. 336. Л. 4.

²³ Российский государственный военный архив. Ф. 34. Оп. 4. Д. 8. Л. 26.

- the Great War provided the conditions for the emergence of the "Spanish" influenza pandemic of 1918–1919. *Vaccine*. 2005; 23(7): 940–5. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.06.035>
12. Erkoreka A. Origins of the Spanish influenza pandemic (1918–1920) and its relation to the First World War. *J. Mol. Genet. Med.* 2009; 3(2): 190–4. <https://doi.org/10.4172/1747-0862.1000033>
 13. Oxford J.S., Sefton A., Jackson R., Innes W., Daniels R.S., Johnson N.P. World War I may have allowed the emergence of "Spanish" influenza. *Lancet Infect. Dis.* 2002; 2(2): 111–4. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(02\)00185-8](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(02)00185-8)
 14. Shortridge K.F. The 1918 'Spanish' Flu: pearls from swine? *Nat. Med.* 1999; 5(4): 384–5. <https://doi.org/10.1038/7383>
 15. Barry J.M. The site of origin of the 1918 influenza pandemic and its public health implications. *J. Transl. Med.* 2004; 2(1): 3. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-2-3>
 16. Radusin M. The Spanish flu – part I: the first wave. *Vojnosanit. Pregl.* 2012; 69(9): 812–7.
 17. Humphries M.O. Paths of infection: the First World War and the origins of the 1918 influenza pandemic. *War Hist.* 2013; 21(1): 55–81. <https://doi.org/10.1177/0968344513504525>
 18. Cheng K.F., Leung P.C. What happened in China during the 1918 influenza pandemic? *Int. J. Inf. Dis.* 2007; 11(4): 360–4. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2006.07.009>
 19. Oxford J.S., Sefton A., Jackson R., Johnson N.P., Daniels R.S. Who's that lady? *Nat. Med.* 1999; 5(12): 1351–2. <https://doi.org/10.1038/70913>
 20. Reid A.H., Fanning T.G., Hultin J.V., Taubenberger J.K. Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza hemagglutinin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96(4): 1651–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.4.1651>
 21. Taubenberger J.K., Morens D.M. 1918 influenza: the mother of all pandemics. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12(1): 15–22. <https://doi.org/10.3201/eid1201.050979>
 22. Morens D.M., Fauci A.S. The 1918 influenza pandemic: insights for the 21st century. *J. Infect. Dis.* 2007; 195(7): 1018–28. <https://doi.org/10.1086/511989>
 23. Brundage J.F., Shanks G.D. Deaths from bacterial pneumonia during 1918–1919 influenza pandemic. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14(8): 1193–9. <https://doi.org/10.3201/eid1408.071313>
 24. Shanks G.D., Brundage J.F. Pathogenic responses among young adults during the 1918 influenza pandemic. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(2): 201–7. <https://doi.org/10.3201/eid1802.102042>
 25. McCullers J.A., Bartmess K.C. Role of neuraminidase in lethal synergism between influenza virus and *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* 2003; 187(6): 1000–9. <https://doi.org/10.1086/368163>
 26. Byerly C.R. *Fever of War: The Influenza Epidemic in the U.S. Army during World War I*. New York: New York University Press; 2005.
 27. Shanks G.D., McKenzie A., McLaughlin R., Waller M., Dennis P., Lee S.E., et al. Mortality risk factors during the 1918–1919 influenza pandemic in the Australian army. *J. Infect. Dis.* 2010; 201(12): 1880–9. <https://doi.org/10.1086/652868>
 28. Barry J.M., Viboud C., Simonsen L. Cross-protection between successive waves of the 1918–1919 influenza pandemic: epidemiological evidence from US Army Camps and from Britain. *J. Infect. Dis.* 2008; 198(10): 1427–34. <https://doi.org/10.1086/592454>
 29. Taubenberger J.K., Baltimore D., Doherty P.C., Markel H., Morens D.M., Webster R.G., et al. Reconstruction of the 1918 influenza virus: unexpected rewards from the past. *mBio*. 2012; 3(5): e00201-12. <https://doi.org/10.1128/mBio.00201-12>
 30. Диагпроптов П.И., Кост Н.А., Иванов Е.М., Елистратов П.И. Об «испанской» болезни. *Известия Народного комиссариата здравоохранения*. 1919; (1): 7–16.
 31. Bauer F., Vögele J. The "Spanish flu" in the German Army 1918 – the perspectives of physicians and generals. *Medizinhist. J.* 2013; 48(2): 117–52. (in German)
 32. Наумов Е.О. Медико-санитарное состояние запасных частей 1-й армии Восточного фронта в Саранске во второй половине 1918 – начале 1919 г. *Гуманитарий: актуальные проблемы гуманитарной науки и образования*. 2018; 18(2): 161–9. <https://doi.org/10.15507/2078-9823.042.018.201802.161-169>
 33. Перуанский А. Об «испанской» болезни. *Известия народного комиссариата здравоохранения*. 1919; (7–8): 32–3.
 34. Прозрение рядового Шоя: Записки американского интервента, восставшего с большевиками на Русском Севере. *Родина*. 2017. № 168. Available at: <https://rg.ru/2017/07/31/rodina-shoy.html>
 35. Барминский. Организация помощи раненым в Архрайоне. В кн.: *Съезд хирургов Красной армии Северного фронта с 20 по 25 октября 1919 г.* Вологда; 1920: 15–6.
 36. Отчеты о научных совещаниях врачей при Рижском военном госпитале. *Врачебный вестник*. 1921; (Январь–Март): 52–71. Available at: https://www.booksite.ru/vrach/1921_1.pdf
 37. Иванов-Дятлов Ф.Г. *Наблюдения врача на Кольском полуострове (11 января – 11 мая 1927)*. Ленинград; 1927.
 38. Paynter S., Ware R.S., Shanks G.D. Host and environmental factors reducing mortality during the 1918–1919 influenza pandemic. *Epidemiol. Infect.* 2011; 139(9): 1425–30. <https://doi.org/10.1017/S0950268811000367>
 39. Martini M., Gazzaniga V., Bragazzi N.L., Barberis I. The Spanish influenza pandemic: a lesson from history 100 years after 1918. *J. Prev. Med. Hyg.* 2019; 60(1): E64–7. <https://doi.org/10.15167/2421-4248/jpmh2019.60.1.1205>
 40. Сизов С.Г. Эпидемическая ситуация в Белом Омске в 1918–1919 гг. и её влияние на повседневную жизнь горожан. В кн.: *Кубанские исторические чтения: Материалы VIII Международной научно-практической конференции*. Краснодар; 2017: 73–80.
 41. Kawana A., Naka G., Fujikura Y., Kato Y., Mizuno Y., Kondo T., et al. Spanish influenza in Japanese Armed Forces, 1918–1920. *Emerg. Infect. Dis.* 2007; 13(4): 590. <https://doi.org/10.3201/eid1304.060615>
 42. Исупов В.А. Население Сибири в условиях Гражданской войны (1918–1922 гг.). В кн.: *Сборник статей Всероссийской научной конференции «Революционная Сибирь: истоки, процессы, наследие»*. Сургут; 2017: 191–202.
 43. Мельниченко В.Ю. *Интернационалисты. Трудящиеся зарубежных стран – участники борьбы за власть советов*. М.: Наука; 1967.
 44. Sanborn J. *Imperial Apocalypse: The Great War and the Destruction of the Russian Empire*. Oxford: Oxford University press; 2015.
 45. Short K.R., Kedzierska K., van de Sandt C.E. Back to the future: lessons learned from the 1918 influenza pandemic. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2018; 8: 343. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00343>
 46. Oei W., Nishiura H. The relationship between tuberculosis and influenza death during the influenza (H1N1) pandemic from 1918–19. *Comput. Math, Methods Med.* 2012; 2012: 124861. <https://doi.org/10.1155/2012/124861>
 47. Langford C.M., Storey P. Influenza in Sri Lanka, 1918–1919: the impact of a new disease in a premodern Third World setting. *Health Transit. Rev.* 1992; (2): 97–123.
 48. Shanks G.D. Synergistic mortality caused by Plasmodium falciparum during the 1918 influenza pandemic. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2015; 92(5): 941–2. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0792>
 49. Ferriere F. Situation epidemique de la Russie. *Int. Rev. Red Cross.* 1922; 4(40): 273–83. <https://doi.org/10.1017/S1026881200000039>

REFERENCES

1. Zatravkin S.N., Khabriev R.U., Shchepin V.O., Sarkisov A.S. The morbidity of infectious diseases in the USSR. Report I. 1919–1949. *Problemy sotsial'noy gigieny, zdravookhraneniya i istorii*

- meditsiny*. 2018; 26(5): 350–6. <https://doi.org/10.32687/0869-866X-2018-26-5-350-356> (in Russian)
2. Lotova E.L., Idel'chik Kh.I. *Fight against Infectious Diseases in the USSR (1917–1967). Essays on History [Bor'ba s infektsionnymi boleznyami v SSSR (1917–1967). Ocherki istorii]*. Moscow: Meditsina; 1967. (in Russian)
 3. Supotnitskiy M.V. The Spanish flu pandemic 1918–1920 in the context of other influenza pandemics and avian influenza. *Meditsinskaya kartoteka*. 2006; (11): 31–4. Available at: <http://www.supotnitskiy.ru/stat/stat51.htm#gl2> (in Russian)
 4. Semashko N.A., ed. *Big Medical Encyclopedia. Volume 8 [Bol'shaya meditsinskaya entsiklopediya. Tom 8]*. Moscow; 1929. (in Russian)
 5. Baroyan O.V. *Results of Half a Century of Infection Control in the USSR and Some Topical Issues of Modern Epidemiology [Itogi poluvekovoy bor'by s infektsiyami v SSSR i nekotorye aktual'nye voprosy sovremennoy epidemiologii]*. Moscow: Meditsina; 1968. (in Russian)
 6. Burgasov P.N. *State and Prospects of Further Reduction of Infectious Diseases in the USSR [Sostoyaniye i perspektivy dal'neyshego snizheniya infektsionnoy zaboлеваemosti v SSSR]*. Moscow: Meditsina; 1987. (in Russian)
 7. Vasil'ev K.G., Segal A.E. *History of Epidemics in Russia [Istoriya epidemiy v Rossii]*. Moscow: Medgiz; 1960. (in Russian)
 8. Vasil'ev K.G. *History of epidemics and their control in Russia in the XX century [Istoriya epidemiy i bor'ba s nimi v Rossii v XX stoletii]*. Moscow: Meditsina; 2001. (in Russian)
 9. Crosby A.W. *America's Forgotten Pandemic: The Influenza of 1918*. Cambridge: University Press; 1989.
 10. Wever P.C., van Bergen L. Death from 1918 pandemic influenza during the First World War: a perspective from personal and anecdotal evidence. *Influenza Other Respir. Viruses*. 2014; 8(5): 538–46. <https://doi.org/10.1111/irv.12267>
 11. Oxford J.S., Lambkin R., Sefton A., Daniels R., Elliot A., Brown R., et al. A hypothesis: The conjunction of soldiers, gas, pigs, ducks, geese and horses in Northern France during the Great War provided the conditions for the emergence of the “Spanish” influenza pandemic of 1918–1919. *Vaccine*. 2005; 23(7): 940–5. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.06.035>
 12. Erkoreka A. Origins of the Spanish influenza pandemic (1918–1920) and its relation to the First World War. *J. Mol. Genet. Med.* 2009; 3(2): 190–4. <https://doi.org/10.4172/1747-0862.1000033>
 13. Oxford J.S., Sefton A., Jackson R., Innes W., Daniels R.S., Johnson N.P. World War I may have allowed the emergence of “Spanish” influenza. *Lancet Infect. Dis.* 2002; 2(2): 111–4. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(02\)00185-8](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(02)00185-8)
 14. Shortridge K.F. The 1918 'Spanish' Flu: pearls from swine? *Nat. Med.* 1999; 5(4): 384–5. <https://doi.org/10.1038/7383>
 15. Barry J.M. The site of origin of the 1918 influenza pandemic and its public health implications. *J. Transl. Med.* 2004; 2(1): 3. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-2-3>
 16. Radusin M. The Spanish flu – part I: the first wave. *Vojnosanit. Pregl.* 2012; 69(9): 812–7.
 17. Humphries M.O. Paths of infection: the First World War and the origins of the 1918 influenza pandemic. *War Hist.* 2013; 21(1): 55–81. <https://doi.org/10.1177/0968344513504525>
 18. Cheng K.F., Leung P.C. What happened in China during the 1918 influenza pandemic? *Int. J. Inf. Dis.* 2007; 11(4): 360–4. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2006.07.009>
 19. Oxford J.S., Sefton A., Jackson R., Johnson N.P., Daniels R.S. Who's that lady? *Nat. Med.* 1999; 5(12): 1351–2. <https://doi.org/10.1038/70913>
 20. Reid A.H., Fanning T.G., Hultin J.V., Taubenberger J.K. Origin and evolution of the 1918 “Spanish” influenza hemagglutinin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96(4): 1651–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.4.1651>
 21. Taubenberger J.K., Morens D.M. 1918 influenza: the mother of all pandemics. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12(1): 15–22. <https://doi.org/10.3201/eid1201.050979>
 22. Morens D.M., Fauci A.S. The 1918 influenza pandemic: insights for the 21st century. *J. Infect. Dis.* 2007; 195(7): 1018–28. <https://doi.org/10.1086/511989>
 23. Brundage J.F., Shanks G.D. Deaths from bacterial pneumonia during 1918–1919 influenza pandemic. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14(8): 1193–9. <https://doi.org/10.3201/eid1408.071313>
 24. Shanks G.D., Brundage J.F. Pathogenic responses among young adults during the 1918 influenza pandemic. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(2): 201–7. <https://doi.org/10.3201/eid1802.102042>
 25. McCullers J.A., Bartmess K.C. Role of neuraminidase in lethal synergism between influenza virus and *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* 2003; 187(6): 1000–9. <https://doi.org/10.1086/368163>
 26. Byerly C.R. *Fever of War. The Influenza Epidemic in the U.S. Army during World War I*. New York: New York University Press; 2005.
 27. Shanks G.D., McKenzie A., McLaughlin R., Waller M., Dennis P., Lee S.E., et al. Mortality risk factors during the 1918–1919 influenza pandemic in the Australian army. *J. Infect. Dis.* 2010; 201(12): 1880–9. <https://doi.org/10.1086/652868>
 28. Barry J.M., Viboud C., Simonsen L. Cross-protection between successive waves of the 1918–1919 influenza pandemic: epidemiological evidence from US Army Camps and from Britain. *J. Infect. Dis.* 2008; 198(10): 1427–34. <https://doi.org/10.1086/592454>
 29. Taubenberger J.K., Baltimore D., Doherty P.C., Markel H., Morens D.M., Webster R.G., et al. Reconstruction of the 1918 influenza virus: unexpected rewards from the past. *mBio*. 2012; 3(5): e00201-12. <https://doi.org/10.1128/mBio.00201-12>
 30. Diatropov P.I., Kost N.A., Ivanov E.M., Elistratov P.I. About the “Spanish” disease. *Izvestiya Narodnogo komissariata zdavookhraneniya*. 1919; (1): 7–16. (in Russian)
 31. Bauer F., Vögele J. The “Spanish flu” in the German Army 1918 – the perspectives of physicians and generals. *Medizinhist. J.* 2013; 48(2): 117–52. (in German)
 32. Naumov E.O. Medical and sanitary state of replacement military units of the first army of the Eastern front in Saransk in the second half of 1918 – the beginning of 1919. *Gumanitarniy: aktual'nye problemy gumanitarnoy nauki i obrazovaniya*. 2018; 18 (42): 166. (in Russian)
 33. Peruanskiy A. About the “Spanish” disease. *Izvestiya narodnogo komissariata zdavookhraneniya*. 1919; (7–8): 32–3. (in Russian)
 34. Private Shoy's insight: notes of an American intervener who fought the bolsheviks in the Russian North. *Rodina*. 2017. Issue 168. Available at: <https://rg.ru/2017/07/31/rodina-shoy.html> (in Russian)
 35. Barminsky. The Organization Aid the Wounded in the Arkhdistrict. In: *Congress of Surgeons of the Red Army of the Northern Front from 20 to 25 October 1919 [S"ezd khirurgov Krasnoy armii Severnogo fronta s 20 po 25 oktyabrya 1919 g.]*. Vologda; 1920: 15–6. (in Russian)
 36. Reports on scientific meetings of the doctors at the Riga military hospital. *Vrachebnyy vestnik*. 1921; (January–March): 52–71. Available at: https://www.booksite.ru/vrach/1921_1.pdf (in Russian)
 37. Ivanov-Dyatlov F.G. *Physician Monitoring on the Kola Peninsula (January 11 – May 11, 1927) [Nablyudeniya vracha na Kol'skom poluostrove (11 yanvarya – 11 maya 1927)]*. Leningrad; 1927. (in Russian)
 38. Paynter S., Ware R.S., Shanks G.D. Host and environmental factors reducing mortality during the 1918–1919 influenza pandemic. *Epidemiol. Infect.* 2011; 139(9): 1425–30. <https://doi.org/10.1017/S0950268811000367>
 39. Martini M., Gazzaniga V., Bragazzi N.L., Barberis I. The Spanish influenza pandemic: a lesson from history 100 years after 1918. *J. Prev. Med. Hyg.* 2019; 60(1): E64–7. <https://doi.org/10.15167/2421-4248/jpmh2019.60.1.1205>

40. Sizov S.G. Epidemic situation in Belyi Omsk in 1918–1919 and its impact on the daily life of the townspeople. In: *Kuban Historical Readings: Proceedings of the VIII International Scientific and Practical Conference [Kubanskie istoricheskie chteniya: Materialy VIII Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii]*. Krasnodar; 2017: 73–80. (in Russian)
41. Kawana A., Naka G., Fujikura Y., Kato Y., Mizuno Y., Kondo T., et al. Spanish influenza in Japanese Armed Forces, 1918–1920. *Emerg. Infect. Dis.* 2007; 13(4): 590. <https://doi.org/10.3201/eid1304.060615>
42. Isupov V.A. The population of Siberia during the Civil War (1918–1922). In: *Collection of Articles of the All-Russian Scientific Conference «Revolutionary Siberia: Origins, Processes, Heritage» [Sbornik statey Vserossiyskoy nauchnoy konferentsii «Revolutsionnaya Sibir': istoki, protsessy, nasledie»]*. Surgut; 2017: 191–202. C (in Russian)
43. Mel'nichenko V.Yu. *Internationalists. Working People of Foreign Countries – Participants in the Struggle for the Power of the Soviets [Internatsionalisty. Trudyashchiesya zarubezhnykh stran – uchastniki bor'by za vlast' sovetov]*. Moscow: Nauka; 1967. (in Russian)
44. Sanborn J. *Imperial Apocalypse: The Great War and the Destruction of the Russian Empire*. Oxford: Oxford University press; 2015.
45. Short K.R., Kedzierska K., van de Sandt C.E. Back to the future: lessons learned from the 1918 influenza pandemic. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2018; 8: 343. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00343>
46. Oei W., Nishiura H. The relationship between tuberculosis and influenza death during the influenza (H1N1) pandemic from 1918–19. *Comput. Math, Methods Med.* 2012; 2012: 124861. <https://doi.org/10.1155/2012/124861>
47. Langford C.M., Storey P. Influenza in Sri Lanka, 1918–1919: the impact of a new disease in a premodern Third World setting. *Health Transit. Rev.* 1992; (2): 97–123.
48. Shanks G.D. Synergistic mortality caused by Plasmodium falciparum during the 1918 influenza pandemic. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2015; 92(5): 941–2. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0792>
49. Ferriere F. Situation epidemique de la Russie. *Int. Rev. Red Cross.* 1922; 4(40): 273–83. <https://doi.org/10.1017/S1026881200000039>

Информация об авторах

Морозова Ольга Михайловна  — д.и.н., доц., проф. кафедры «Связи с общественностью» ФГБОУ ВО «Донской государственный технический университет», 344000, Ростов-на-Дону, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8232-8189>.
E-mail: olgafrost@gmail.com

Трошина Татьяна Игоревна — д.и.н., доц., проф. кафедры социальной работы и социальной безопасности Института комплексной безопасности ФГАОУ ВО «Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова», 163002, Архангельск, Россия; кафедра гуманитарных наук ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет», 163000, Архангельск, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5517-5949>.

Морозова Елена Николаевна — доктор медицины, врач-терапевт, Элмбрук мемориал госпитал, 53045, Брукфилд, Висконсин, США.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6966-7442>.

Морозов Александр Николаевич — к.м.н., ст. ординатор по онкологии, МУБУ «Клинико-диагностический центр "Здоровье" города Ростова-на-Дону», 344011, Ростов-на-Дону, Россия.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-5954-1042>.

Участие авторов: О.М. Морозова и Е.Н. Морозова задумали исследование, Е.Н. Морозова и А.Н. Морозов провели поиск литературы, О.М. Морозова и Т.И. Трошина собрали архивные материалы, О.М. Морозова и А.Н. Морозов написали проект рукописи. Все авторы критически переработали рукопись. Все авторы прочитали и одобрили последнюю версию рукописи.

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

Статья поступила в редакцию 11.11.2020;
принята к публикации 15.12.2020;
опубликована 03.02.2021.

Information about the authors

Olga M. Morozova  — Dr. Sci. (History), Prof., Department of public relation, Don State Technical University, 344000, Rostov-on-Don, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8232-8189>.
E-mail: olgafrost@gmail.com

Tatiana I. Troshina — Dr. Sci. (History), Assoc. Prof., Prof., Department of social work and social security of the Institute of Integrated Security, Northern (Arctic) Federal University named after M.V. Lomonosov, 163002, Arkhangelsk, Russia; Department of humanities, Northern State Medical University, 163000, Arkhangelsk, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5517-5949>.

Elena N. Morozova — D.M., internal medicine specialist, Elmbrook Memorial Hospital, 53045, Brookfield, WI, USA
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6966-7442>.

Aleksandr N. Morozov — PhD (Med.), senior oncology resident, Clinical and Diagnostic Center «Zdorov'e» of the city of Rostov-on-Don, 344011, Rostov-on-Don, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5954-1042>.

Authors' contributions: O.M. Morozova and E.N. Morozova conceived the study, E.N. Morozova and A.N. Morozov performed a search of the literature, O.M. Morozova and T.I. Troshina collected archive material, O.M. Morozova and A.N. Morozov drafted the manuscript. All authors critically revised the manuscript. All authors have read and approved the latest version of the manuscript.

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

The article was submitted 11.11.2020;
accepted for publication 15.12.2020; published 03.02.2021.

НЕКРОЛОГИ

Памяти Евгения Николаевича Беляева

(22 октября 1937 – 25 января 2021)



«У каждого времени есть свои отличительные черты. Но гордость за свою родину, стремление сделать ее сильнее, а народ — богаче должны быть у каждого россиянина.»

Е.Н. Беляев

Коллектив Федерального центра гигиены и эпидемиологии и вся санитарно-эпидемиологическая служба Российской Федерации понесли невосполнимую утрату — 25 января 2021 года на 84-м году жизни скончался ученый, организатор отечественного здравоохранения и медицинской науки, государственный деятель, академик Российской академии медико-технических наук и Международной академии информатизации, член-корреспондент РАМН (2005 г., в настоящее время — РАН), главный государственный санитарный врач РСФСР (1990–1992 гг.), главный государственный санитарный врач Российской Федерации (1992–1996 гг.), доктор медицинских наук, профессор (1999 г.), заслуженный врач Российской Федерации (2002 г.) Евгений Николаевич Беляев.

Евгений Николаевич родился 22 октября 1937 г. в пос. Песковка Омутнинского района Кировской области. В 1961 г. окончил санитарно-гигиенический факультет Пермского государственного медицинского института. Работал помощником санитарного врача, санитарным врачом, заведующим отделом, заместителем главного врача Пермской областной санэпидстанции, главным врачом Пермской городской санэпидстанции, главным государственным санитарным врачом Пермской области (1975–1986 гг.), в Пермском обкоме КПСС (1971–1975 гг.).

После перевода в Министерство здравоохранения РСФСР в 1986–1991 гг. работал начальником Главного санэпидуправления, а в последующем заместителем министра — главным государственным санитарным врачом РСФСР. Евгений Николаевич обладал колоссальным опытом практической работы в санэпидслужбе, понимал необходимость ее реформирования и приложил немало усилий для внедрения элементов централизации управления и финансирования первичного звена учреждений, совершенствования работы в условиях нового хозяйственного механизма, разработки санитарного законодательства.

С июля 1991 г. по май 1996 г. Евгений Николаевич Беляев — председатель Государственного комитета санитарно-эпидемиологического надзора РСФСР, Государственного комитета санитарно-эпидемиологического надзора при Президенте РСФСР, главный государственный санитарный врач РСФСР; председатель Государственного комитета санитарно-эпидемиологического надзора Российской Федерации, главный государственный санитарный врач Российской Федерации.

С именем Евгения Николаевича связаны одни из наиболее ярких страниц истории санитарно-эпидемиологической службы России, проведение коренных реформ в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения в период глубоких политических, экономических и социальных преобразований, происходивших в стране в конце 1980-х – начале 1990-х гг.

Среди первых законов социальной направленности 19 апреля 1991 г. Верховным Советом РСФСР был принят первый в истории санэпидслужбы закон «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения», определяющий новую структуру, функции и полномочия, место и роль санэпидслужбы в системе органов государственной власти. В последующем были разработаны и приняты законы «О предупреждении распространения в Российской Федерации заболевания, вызываемого вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ-инфекции)» (1995 г.), «О радиационной безопасности населения» (1996 г.) и др. Под руководством Евгения Николаевича в сжатые сроки была разработана Концепция развития госсанэпидслужбы, формирования системы государственного санитарно-гигиенического нормирования, а также закреплена на правовом уровне целостная система финансового обеспечения учреждений, направленная на сохранение их структуры, материально-технического и кадрового потенциала. В эти годы была осуществлена теоретическая и методологическая разработка основ социально-гигиенического мониторинга — государ-

ственной системы наблюдений за состоянием здоровья населения и среды обитания, их анализа, оценки и прогноза, а также определения причинно-следственных связей между состоянием здоровья населения и воздействием факторов среды обитания. Выявленные приоритетные проблемы позволили разработать и реализовать федеральные целевые программы по профилактике и борьбе с инфекционными болезнями, решать задачи оздоровления окружающей среды.

Разносторонний практический опыт и высокий профессионализм Евгения Николаевича позволили ему неоднократно возглавлять правительственные комиссии по расследованию и ликвидации чрезвычайных ситуаций на территории Российской Федерации, в том числе при эпидемических вспышках: последний аварии на Чернобыльской АЭС, землетрясения в Нефтегорске Сахалинской области, массовых заболеваний в Иркутске, Волгограде, Армавире, Мантурове. В должности заместителя председателя Чрезвычайной противэпидемической комиссии Совмина РСФСР (затем Санитарно-противоэпидемическая комиссия Правительства) Евгений Николаевич Беляев координировал деятельность органов исполнительной власти для стабилизации санитарно-эпидемиологической обстановки в стране.

В 1996 г. Евгений Николаевич стал главным врачом Российского республиканского информационно-аналитического центра — заместителем главного государственного санитарного врача России, позже — советником главного врача по научным вопросам ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. По его инициативе он был переименован в Федеральный центр государственного санитарно-эпидемиологического надзора Министерства здравоохранения Российской Федерации.

В 1996–2013 гг. Евгений Николаевич возглавлял кафедру социальной гигиены и организации госсанэпидслужбы с курсом основ лабораторного дела медико-профилактического факультета последипломного профессионального образования Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова (затем Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова).

Свою организаторскую и практическую деятельность Евгений Николаевич всегда сочетал с научной и по праву являлся одним из ведущих ученых Российской Федерации в области организации и управления санитарно-эпидемиологической службой. Кандидатскую диссертацию на тему «Санитарно-эпидемиологическое благополучие как основа охраны здоровья населения России» он защитил в 1994 г., докторскую на тему «Научные основы стратегии развития санитарно-эпидемиологической службы и обеспечения здоровья населения в современных условиях» — в 1996 г. В этом же году Евгений Николаевич избран председателем Общества гигиенистов и санитарных врачей, а с 1997 г. назначен руководителем Центрального органа по аккредитации лабораторий в системе

учреждений госсанэпидслужбы и стал председателем Лабораторного совета госсанэпидслужбы России. В 1999 г. ему присвоено звание профессора, а в 2008 г. он стал лауреатом премии Правительства Российской Федерации в области науки и техники.

Основные научные исследования Евгения Николаевича посвящены созданию условий для формирования здоровья населения и влиянию факторов окружающей среды с учетом климатических, национальных и социальных особенностей; разработке научных основ организации и управления санитарно-эпидемиологическим благополучием населения; вопросам питания и качества пищевых продуктов в системе социально-гигиенического мониторинга, продовольственной безопасности Российской Федерации. Евгений Николаевич принимал непосредственное участие в подготовке законодательных и нормативных актов по данным проблемам. Он автор более 300 научных публикаций, посвященных гигиеническим проблемам охраны здоровья человека и обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения, включая 34 монографии и руководства. Под его руководством защищено 7 докторских и 10 кандидатских диссертаций.

В 2005 г. Евгений Николаевич Беляев избран членом-корреспондентом РАМН. Многогранна и общественная деятельность Евгения Николаевича: он был членом редколлегий двух медицинских журналов, диссертационного совета при ПМГМУ им. И.М. Сеченова. Евгений Николаевич являлся членом российских и зарубежных академий: действительным членом Академии медико-технических наук, членом Международной академии информационных процессов и технологий (с 1994 г.); академиком Академии проблем безопасности, обороны и правопорядка (с 2004 г.), почетным членом Национального союза медико-биологической защиты (с 2005 г.).

Евгений Николаевич награжден многими государственными и ведомственными наградами: орденом «Знак Почета» (1971 г.), четырьмя медалями, значком «Отличнику здравоохранения» (1978 г.), почетными грамотами Правительства Российской Федерации. Ему присвоено почетное звание «Заслуженный врач Российской Федерации» (2002 г.), вручены ведомственные награды Роспотребнадзора.

Жизненный путь Евгения Николаевича был насыщен выдающимися достижениями, а его мудрость и энергия вызывают восхищение. Его опыт и знания бесценны, но еще более ценным является пример человека. Для коллег, для всех нас Евгений Николаевич останется примером ученого, врача, гуманиста и друга. Евгений Николаевич вызывал чувство глубокого уважения и восхищения как чуткий, добрый, внимательный врач и человек, готовый всегда прийти на помощь. Обладая огромным личным обаянием, богатым житейским опытом, широкой эрудицией и душевной теплотой, он всегда притягивал к себе людей.

Глубокая скорбь и чувство невосполнимой утраты у нас сегодня.

Спасибо Вам, Евгений Николаевич!

НЕКРОЛОГИ

Памяти Николая Николаевича Филатова

(28 мая 1954 – 4 февраля 2021)



4 февраля 2021 года на 67-м году жизни скончался член-корреспондент РАН (2016 г.), профессор (2002 г.), доктор медицинских наук (1999 г.), Заслуженный врач Российской Федерации (2003 г.) **Николай Николаевич Филатов** — известный эпидемиолог, учёный, практик, педагог и организатор ответственного здравоохранения.

Николай Николаевич родился 28 мая 1954 г. в Северо-Задонске Тульской области. С 1977 г. по окончании санитарно-гигиенического факультета Первого Московского медицинского института им. И.М. Сеченова работал врачом-эпидемиологом в городе Комсомольск-на-Амуре.

Н.Н. Филатов известен медицинскому сообществу как выдающийся организатор госсанэпидслужбы и эпидемиолог с большим практическим опытом. В начале 1980-х гг. по возвращении в Москву он был назначен заведующим эпидемиологическим отделом санитарно-эпидемиологической станции Ленинского района, а затем — городской санитарно-эпидемиологической службы. При непосредственном участии Н.Н. Филатова и его руководством разработаны и внедрены в противозидемическую практику новые, современные методы эпидемиологического анализа и надзора за актуальными инфекционными болезнями (стрептококковыми, кишечными и многими другими).

С 1993 по 2012 г. Николай Николаевич возглавлял санитарно-эпидемиологическую службу г. Москвы. Став Главным государственным санитарным

врачом в одном из самых сложных и ответственных регионов России, он успешно применял на практике результаты основных направлений своей научной деятельности. В эти годы под его руководством была сформирована система социально-гигиенического мониторинга, обеспечивающая эпидемиологическое благополучие столицы, разработан и утвержден региональный календарь профилактических прививок, создана стратегия сдерживания эпидемического роста заболеваемости острыми респираторными инфекциями, внедрена система санитарно-эпидемиологической охраны столицы от завоза и распространения опасных инфекционных болезней. Н.Н. Филатов неоднократно проявлял незаурядные профессиональные способности при организации противоэпидемических мероприятий, проводя эпидемиологические расследования вспышек различных инфекционных заболеваний. Его ответственность, решительность и принципиальность, а также богатые знания и практический опыт позволили спасти многие тысячи жизней.

Практическую работу Н.Н. Филатов успешно совмещал с научной деятельностью и преподаванием эпидемиологии. С 1985 по 1989 г. он проходил обучение в заочной аспирантуре ММА им. И.М. Сеченова, позднее успешно защитил кандидатскую диссертацию. С 1996 г. Николай Николаевич работал в должности доцента, а затем профессора кафедры эпидемиологии медико-профилактического факультета ММА им. И.М. Сеченова. В 2007 г. назначен заведующим кафедрой эпидемиологии Института профессионального образования Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, которую возглавлял до последних дней жизни.

С 2012 г. Николай Николаевич являлся заместителем директора по научной работе ФГБУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», а также руководителем лаборатории эпидемиологического анализа и мониторинга инфекционных заболеваний данного института.

За заслуги в области науки Н.Н. Филатов был избран членом-корреспондентом Международной академии информатизации, а также академиком Академии естественных наук. Труды Н.Н. Филатова получили высокую государственную оценку — за плодотворную деятельность по развитию науки, образования и здравоохранения он награжден орденом

Дружбы и медалью «В память 850-летия Москвы». Является дважды лауреатом премий Правительства Российской Федерации: в области науки и техники (1998 г.), а также в области образования (2013 г.), присужденной за цикл трудов «Учебно-методическое обеспечение непрерывного образовательного процесса по подготовке медицинских кадров».

Профессор Н.Н. Филатов опубликовал более 300 научных работ, включая монографии и статьи в профильных российских и зарубежных научных журналах. Под его руководством подготовлено и защищено 10 кандидатских и 2 докторских диссертации, сформирована научная школа, до самого последнего момента проводились научные исследования, где с теоретических и клинических позиций осуществлялось комплексное рассмотрение актуальных проблем эпидемиологии и инфекционных болезней.

Н.Н. Филатов являлся членом редакционных коллегий ведущих российских журналов эпидемиологического профиля — «Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии» и «Эпидемио-

логия и инфекционные болезни», а также входил в редакционный совет журнала «Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы».

Всему медицинскому сообществу Николай Николаевич Филатов запомнится как разносторонний учёный-исследователь, внесший значительный вклад в развитие теории и практики эпидемиологии.

Николай Николаевич был не только замечательным руководителем, целеустремленным, принципиальным и честным учёным, но и участливым, всегда искренним и сопереживающим человеком, готовым подставить плечо и прийти на помощь в трудную минуту.

Светлая память о Николае Николаевиче, выдающемся учёном, отзывчивом, исключительно порядочном, прекрасном человеке, заботливом семьянине и верном друге, навсегда сохранится в сердцах родственников, коллег, учеников и друзей.

Он был и продолжает оставаться для нас примером врача, учёного, педагога, руководителя, Человека.

Редакционная коллегия и редакция журнала

Календарь мероприятий 2021

17 марта

Онлайн-семинар

Аллергология: новые горизонты

7 апреля

Онлайн-семинар

**Инфекции, передаваемые клещами:
диагностика и разбор клинических случаев**

28-29 апреля

Онлайн-конгресс с международным участием

**Молекулярная диагностика
и биобезопасность-2021. COVID-19:
эпидемиология, диагностика, профилактика**

12-13 мая

Цикл онлайн-семинаров

**Актуальные проблемы диагностики,
профилактики и терапии острых кишечных
инфекций**

24-26 мая

XIII Ежегодный Всероссийский конгресс по инфекционным
болезням имени академика В.И. Покровского

**Инфекционные болезни в современном мире:
текущие и будущие угрозы**

16 июня

Онлайн-семинар

Иммунопрофилактика

8 сентября

Онлайн-семинар

Микробиота и антибиотикорезистентность

7-8 октября

Всероссийская научно-практическая конференция
с международным участием

**Современная иммунопрофилактика:
вызовы, возможности, перспективы**

13 октября

Онлайн-семинар

**Междисциплинарный диалог
с практиком о новых методах
в эпидемиологии**

17 ноября

Онлайн-семинар

**Диагностика и лечение урогенитальных
и внутриутробных инфекций**

25-26 ноября

IX Конгресс с международным участием

**Контроль и профилактика инфекций,
связанных с оказанием медицинской
помощи ИСМП-2021**

15 декабря

Онлайн-семинар

**Вирусные гепатиты: эпидемиология,
диагностика и современные возможности
лечения**

