

3

МАЙ – ИЮНЬ

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

3

MAY – JUNE

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 базу данных SCOPUS и рекомендованный ВАК «Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук» по специальностям:
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)

3

МАЙ – ИЮНЬ

**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.
Переводы публикуются на сайте
журнала.

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

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

*Начальник редакционно-
издательского отдела:*
Осокина Ольга Владимировна
Заведующая редакцией:
Устинкова Ольга Владимировна

Редакция не несет ответственности
за содержание рекламных
материалов.

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

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

Подписано в печать 27.06.2021.
Формат 60×90¹/₈. Тираж 280 экз.
Усл.-печ. л. 6,5.

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

© 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., член-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

Козлов Р.С., д.м.н., проф., член-корр. РАН, ректор, Смоленский государственный медицинский университет, Смоленск

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

Иностранные члены редакционной коллегии

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

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

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

Helmut Hahn, MD, PhD, Professor, 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

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

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

Тотолян 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

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

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

**JOURNAL
of MICROBIOLOGY,
EPIDEMIOLOGY
AND
IMMUNOBIOLOGY**
(Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii)

Bimonthly scientific and practical journal

Founded in 1924

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

The journal accepts for publication Russian and foreign research papers, lectures, methodological materials, legislative documents in the field of preserving the epidemiological well-being of the population.

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

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

of Education and Science:

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)

3

MAY – JUNE

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

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

The CrossMark service is used.

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

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

EDITORIAL OFFICE:

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

Head of the Editorial and publishing department:
Olga V. Osokina

Head of Editorial Office:
Olga V. Ustinkova

The Editorial Board is not responsible for the advertising content.

The materials that do not meet the requirements of the journal (www.microbiol.elpub.ru) are rejected without further consideration.

When the author submits an article to the Editorial Board, he/she accepts the terms and conditions of the public offer agreement (<https://microbiol.elpub.ru/jour>).

Signed to the press on June 24, 2021.
Print format 60×90^{1/8}.
Circulation 250 copies.

Printed at the Ob'yedinenny poligraficheskiy kompleks Ltd. 115114, 7C2, Derbenevskaya emb., Moscow, Russian Federation.
E-mail: info@opk.bz
www.opk.bz

© Central Research Institute of Epidemiology, 2021

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

Roman S. Kozlov, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Rector, Smolensk State Medical University, Smolensk

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

Foreign members of the Editorial Board

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

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

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

Helmut Hahn, MD, PhD, Professor, 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

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

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. Tartakovsky, 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

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

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

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

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

Murad K. Mamadov, MD, DSc, Professor, National Oncology Center of the Ministry of Health of the Republic of Azerbaijan, Baku, Republic of Azerbaijan

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Грачева А.В., Корчевая Е.Р., Кудряшова А.М., Борисова О.В., Петруша О.А., Смирнова Д.И., Чернышова И.Н., Свитич О.А., Зверев В.В., Файзулов Е.Б.** Адаптация МТТ-теста для определения нейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2* 253
- Чезганова Е.А., Ефимова О.С., Сахарова В.М., Ефимова А.Р., Созинов С.А., Исмагилов З.Р., Брусина Е.Б.** Дополнительный резервуар госпитальных микроорганизмов в медицинских организациях* 266
- Бухарин О.В., Андрющенко С.В., Перунова Н.Б., Иванова Е.В.** Механизм персистенции индигенных бифидобактерий под действием ацетата в кишечном биотопе человека 276
- Зайцев Е.М., Брицина М.В., Озерецковская М.Н., Мерцалова Н.У., Бажанова И.Г.** Влияние антител к агглютиногенам 1 и 2, филаментозному гемагглютинирующему токсину на формирование биоплёнок *Bordetella pertussis* на абиотическом субстрате 283
- Погожова М.П., Гаевская Н.Е., Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Аноприенко А.О., Романова Л.В., Тюрина А.В.** Биологические свойства и генетическая характеристика экспериментальных диагностических бактериофагов *Vibrio cholerae* 290
- Щуковская Т.Н., Гончарова А.Ю., Бугоркова С.А., Ерохин П.С., Кудрявцева О.М.** Оценка действия азоксимера бромида (полиоксидония) на адгезивные свойства вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ по данным атомно-силовой микроскопии 298
- Батулин А.А., Ткаченко Г.А., Леденева М.Л., Лемасова Л.В., Бондарева О.С., Кайсаров И.Д., Шпак И.М., Бородай Н.В., Король Е.В., Тетерятникова Н.Н.** Молекулярно-генетический анализ вариантов вируса Западного Нила, циркулировавших на территории европейской части России в 2010–2019 гг. 308

ОБЗОРЫ

- Сацук А.В., Солопова Г.Г., Плоскирева А.А.** Систематический обзор вспышек гемоконтактных инфекций (гепатит В, С, ВИЧ), передающихся от пациента к пациенту при оказании медицинской помощи* 319
- Благодрава А.С., Жилиева Т.В., Квашина Д.В.** Нарушения кишечной микробиоты при расстройствах аутистического спектра: новые горизонты в поиске патогенетических подходов к терапии. Часть 3. Потенциальные стратегии влияния на ось кишечник–мозг для коррекции симптомов расстройств аутистического спектра 331

НАУКА И ПРАКТИКА

- Мионов К.О., Титков А.В., Кулешов К.В., Колясникова Н.М., Бондаренко Е.И., Платонов А.Е.** Разработка и практическое применение методики для идентификации поверхностных антигенов *Borrelia miyamotoi** 339
- Кукаркина В.А., Голубкова А.А., Подымова А.С.** Распространённость туберкулеза у детей, перинатально экспонированных ВИЧ и ВИЧ-инфицированных, и предикторы его развития* 351

НЕКРОЛОГИ

- Памяти Ханса-Дитера Кленка 362
- Памяти Людмилы Павловны Зуевой 364

ЮБИЛЕИ

- К 90-летию юбилею академика РАН Дмитрия Константиновича Львова 365

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

CONTENTS

ORIGINAL RESEARCHES

Gracheva A.V., Korchevaya E.R., Kudryashova A.M., Borisova O.V., Petrusha O.A., Smirnova D.I., Chernyshova I.N., Svitich O.A., Zverev V.V., Faizuloev E.B. Adaptation of the MTT assay for detection of neutralizing antibodies against the SARS-CoV-2 virus*	253
Chezganova E.A., Efimova O.S., Sakharova V.M., Efimova A.R., Sozinov S.A., Ismagilov Z.R., Brusina E.B. The additional reservoir of hospital environment microorganisms at healthcare facilities*	266
Bukharin O.V., Andryuschenko S.V., Perunova N.B., Ivanova E.V. Mechanism of persistence of indigenous bifidobacteria under the impact of acetate in the human colon biotope	276
Zaytsev E.M., Britsina M.V., Ozeretskovskaya M.N., Mertsalova N.U., Bazhanova I.G. Effect of antibodies to agglutinogens 1 and 2, filamentous hemagglutinin and pertussis toxin on formation of <i>Bordetella pertussis</i> biofilms on abiotic substrate	282
Pogozhova M.P., Gayevskaya N.E., Vodopyanov A.S., Pisanov R.V., Anoprienko A.O., Romanova L.V., Tyurina A.V. Biological properties and genetic characteristics of experimental diagnostic <i>Vibrio cholerae</i> bacteriophages	290
Shchukovskaya T.N., Goncharova A.Y., Bugorkova S.A., Erokhin P.S., Kudryavtseva O.M. Evaluation of azoximer bromide (polyoxidonium) influence on the adhesive properties of the <i>Yersinia pestis</i> EV NIIEG vaccine strain by atomic force microscopy	298
Baturin A.A., Tkachenko G.A., Ledeneva M.L., Lemasova L.V., Bondareva O.S., Kaysarov I.D., Shpak I.M., Boroday N.V., Korol' E.V., Teteryatnikova N.N. Molecular genetic analysis of West Nile virus variants circulating in European Russia between 2010 and 2019.....	308

REVIEWS

Sacuk A.V., Solopova G.G., Ploskireva A.A. A systematic review of outbreaks of bloodborne infections (hepatitis B and C, HIV) transmitted from patient to patient in healthcare settings*	319
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 3. Potential strategies of influence on gut-brain axis for correction of symptoms of autism spectrum disorders	331

SCIENCE AND PRACTICE

Mironov K.O., Titkov A.V., Kuleshov K.V., Kolyasnikova N.M., Bondarenko E.I., Platonov A.E. Development and application of the technique for identification of <i>Borrelia miyamotoi</i> surface antigens*	339
Kukarkina V.A., Golubkova A.A., Podymova A.S. Prevalence of tuberculosis among children perinatally exposed to HIV and HIV-infected and predictors of its development*	351

OBITUARIES

In memory of Hans-Dieter Klenk	362
In memory of Luydmila Pavlovna Zueva	364

ANNIVERSARIES

To the 90 th anniversary of the academician of the Russian Academy of Sciences Dmitry Konstantinovich Lvov	365
---	-----

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

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-136>



Адаптация МТТ-теста для определения нейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2

Грачёва А.В., Корчевая Е.Р., Кудряшова А.М., Борисова О.В., Петруша О.А., Смирнова Д.И., Чернышова И.Н., Свитич О.А., Зверев В.В., Файзулов Е.Б. 

НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

Аннотация

Введение. Основным показателем специфической активности антител к вирусу SARS-CoV-2 является их способность нейтрализовать вирус. Тест на вируснейтрализующие антитела (ВНА) широко востребован в различных направлениях биомедицинских исследований.

Целью работы являлся подбор оптимальных условий для определения ВНА к вирусу SARS-CoV-2 по ингибированию цитопатогенного действия (ЦПД) в культуре клеток с возможностью как микроскопического, так и спектрофотометрического учёта результата.

Материалы и методы. Сыворотку крови реконвалесцентов COVID-19 и здоровых лиц ($n = 96$) изучали методом ИФА. Коронавирус SARS-CoV-2, штамм Dubrovka (номер GenBank: MW514307.1) выращивали в культуре клеток Vero CCL81 (ATCC). Идентификацию вируса проводили методами ОТ-ПЦР-РВ, ИФА и секвенирования по Сэнгеру. Результаты реакции нейтрализации (РН) учитывали по ЦПД микроскопически и в метилтетразолиевом (МТТ) тесте.

Результаты. От больного COVID-19 изолирован коронавирус SARS-CoV-2 и адаптирован к выращиванию в культуре клеток. При заражении низкой дозой ($MOI = 0,00001$) вирус вызывал выраженное ЦПД с выживаемостью клеток менее 3%, что позволяло учитывать результаты РН по ингибированию ЦПД. Сравнительный анализ сывороток в РН и методом ИФА показал достоверную корреляцию между титрами ВНА и титрами антител к RBD-домену S-белка (Спирмен $r = 0,714$; $p < 0,001$). Результаты определения ВНА с микроскопической и спектрофотометрической детекцией (тест МТТ) также достоверно коррелировали (Спирмен $r = 0,963$; $p < 0,05$).

Заключение. На основе адаптированного к культуре клеток Vero вируса SARS-CoV-2 разработана система оценки титра ВНА, позволяющая учитывать результат как с помощью микроскопического исследования, так и спектрофотометрически в МТТ-тесте. Применение теста МТТ позволяет автоматизировать учёт результатов РН, проводить статистическую обработку получаемых данных, снижает субъективизм при оценке результата. Являясь витальным красителем, МТТ выявляет только живые клетки, что повышает надёжность получаемых результатов по сравнению с другими красителями.

Ключевые слова: реакция нейтрализации, коронавирус SARS-CoV-2, МТТ-тест, вируснейтрализующие антитела

Этическое утверждение. Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен этическим комитетом НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова.

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-60079.

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

Для цитирования: Грачёва А.В., Корчевая Е.Р., Кудряшова А.М., Борисова О.В., Петруша О.А., Смирнова Д.И., Чернышова И.Н., Свитич О.А., Зверев В.В., Файзулов Е.Б. Адаптация МТТ-теста для определения нейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2021;98(3): 253–265.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-136>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-136>

Adaptation of the MTT assay for detection of neutralizing antibodies against the SARS-CoV-2 virus

Anastasiia V. Gracheva, Ekaterina R. Korchevaya, Alexandra M. Kudryashova, Olga V. Borisova, Olga A. Petrusha, Daria I. Smirnova, Irina N. Chernyshova, Oksana A. Svitich, Vitaly V. Zverev, Evgeny B. Faizuloev[✉]

I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. The ability of SARS-CoV-2 antibodies to neutralize the virus is the primary indicator of their specific activity. The test for virus neutralizing antibodies (NAbs) is much needed in different biomedical studies.

The aim of the study is to find optimum conditions for microscopic and spectrophotometric detection of SARS-CoV-2 NAbs by inhibition of cytopathic effect (CPE) in cell cultures.

Materials and methods. Blood sera collected from COVID-19 convalescent patients and healthy individuals ($n = 96$) were tested using the ELISA method. The SARS-CoV-2 coronavirus, Dubrovka strain (GenBank accession no. MW514307.1) was grown in culture medium of Vero cell line CCL-81 (ATCC). Real-time RT-PCR, ELISA, and Sanger sequencing were used for detection of the virus. The results of the neutralization test (NT) were assessed through the microscopic examination for CPE and by the methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay.

Results. SARS-CoV-2 was isolated from a COVID-19 patient and adapted to grow in cell culture. At a low dose of infection (MOI = 0.00001), the virus caused a pronounced CPE with the cell viability less than 3%, thus making it possible to assess NT results by CPE inhibition. The NT and ELISA-based comparative study of sera showed positive correlation between virus NAb titers and Nab titers to S-protein RBD (Spearman's $r = 0.714$; $p < 0.001$). The results of NAbs microscopic and spectrophotometric detection (the MTT assay) also demonstrated positive correlation (Spearman's $r = 0.963$; $p < 0.05$).

Conclusion. The SARS-CoV-2 virus adapted to Vero cell culture served to develop a NAb titer assessment system, which can be used both in microscopic studies and for an MTT assay in spectrophotometric studies. The MTT assay provides automated reading of NT results, optimizes the statistical analysis of the obtained data, and minimizes subjectivity in assessment of results. Being a vital dye, MTT penetrates only viable cells, thus contributing to the reliability of the obtained results compared to other dyes.

Keywords: neutralization test, SARS-CoV-2 coronavirus, MTT assay, virus neutralizing antibodies

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera.

Funding source. The research was carried out with the financial support of the RFBR in the framework of scientific project № 20-04-60079.

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

For citation: Gracheva A.V., Korchevaya E.R., Kudryashova A.M., Borisova O.V., Petrusha O.A., Smirnova D.I., Chernyshova I.N., Svitich O.A., Zverev V.V., Faizuloev E.B. Adaptation of the MTT assay for detection of neutralizing antibodies against the SARS-CoV-2 virus. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(3):253–265.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-136>

Введение

Новый коронавирус человека SARS-CoV-2, открытый в декабре 2019 г. в Китае, стал причиной пандемии, унесшей в мире за 2020 г. более 2 млн жизней. Исследования закономерностей иммунного ответа на инфекцию нового коронавируса являются ключевыми для разработки эффективных средств специфической профилактики и иммунотерапии. На сегодняшний день разработано и внедрено в практику лабораторной диагностики множество иммунохимических (преимущественно иммуноферментных) тест-систем для выявления и количественного определения специфических IgG- и IgM-антител к SARS-CoV-2 [1, 2]. Однако

эти тесты не позволяют оценить функциональную активность специфических антител, например их способность нейтрализовать вирус. Вируснейтрализующие антитела (ВНА) в основном направлены к рецепторсвязывающему домену (RBD) поверхностного гликопротеина S SARS-CoV-2 и при взаимодействии с ним блокируют способность вируса связываться с вирусным рецептором ACE2 на поверхности клетки мишени [3, 4] (рис. 1).

Пассивный перенос моноклональных антител, специфичных RBD-домену, чувствительным к инфекции SARS-CoV-2 животным (мыши, хомяки и макаки резусы) показал протективную активность этих препаратов [3–5]. Имеется также положитель-

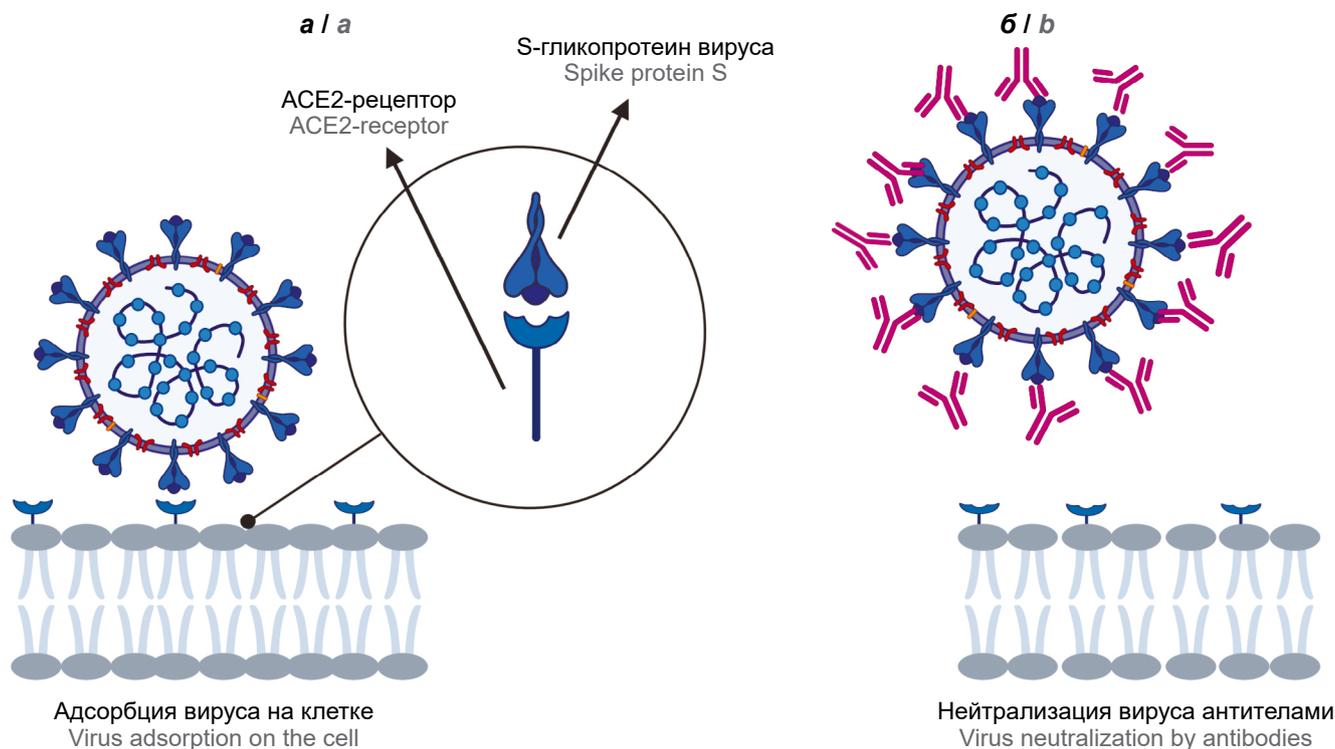


Рис. 1. Схематическое изображение нейтрализации вируса SARS-CoV-2 антителами.

a — адсорбция вириона на клетке-мишени SARS-CoV-2 путём образования связи между гликопротеином S вируса и клеточным ACE-рецептором; *b* — ВНА блокируют адсорбцию вируса на клетке-мишени.

Изображение выполнено в онлайн-программе BioRender. URL: <https://biorender.com>.

Fig. 1. Schematic representation of SARS-CoV-2 neutralization by antibodies.

a — virion adsorption on the SARS-CoV-2 target cell by binding the S glycoprotein and the ACE receptor; *b* — NABs inhibit the virus adsorption on the target cell.

The representation is created with BioRender's web-based software.

ный клинический опыт применения плазмы реконвалесценто́в для лечения пациентов с COVID-19 [6, 7]. Наличие в препаратах плазмы крови реконвалесценто́в и моноклональных антител ВНА является признаком их протективной активности. Основным показателем специфической активности большинства профилактических вакцин против COVID-19 также является наличие ВНА в сыворотке крови вакцинированных лиц [6]. Таким образом, тест на ВНА широко востребован в области биомедицинских исследований.

Традиционные методы оценки активности нейтрализующих SARS-CoV-2 антител основаны на способности ВНА ингибировать бляшкообразование или цитопатогенное действие (ЦПД) вируса на чувствительной культуре клеток [8]. Поскольку работа ведётся с вирулентным штаммом вируса, эти исследования выполняются в лабораториях, отвечающих требованиям безопасности работ с патогенными биологическими объектами II группы патогенности. Также описаны несколько альтернативных подходов к определению ВНА, не требующих работы с вирусом. Это «суррогатные» тест-системы, основанные на твердофазном ИФА с рекомбинантными пептидами RBD и ACE-рецептором [9, 10], использовании

псевдовиральных частиц на основе рекомбинантных вирусов и различных репортерных систем [11, 12]. Некоторые альтернативные подходы к определению ВНА позволяют получать результат значительно быстрее, чем методы, основанные на регистрации вирусного ЦПД. Однако, несмотря на отмеченные ограничения, традиционные методы титрования остаются «золотым стандартом» определения ВНА, поскольку наиболее точно моделируют естественный процесс нейтрализации вируса антителами. Важно отметить, что, вопреки устоявшемуся мнению, нейтрализующие SARS-CoV-2 антитела направлены не только к эпитопам RBD, но и к эпитопам других доменов белка S [5, 13, 14]. Таким образом, только традиционные культуральные методы оценки ВНА способны выявлять весь спектр циркулирующих в крови нейтрализующих SARS-CoV-2 антител, тогда как «суррогатные» тест-системы, основанные на твердофазном ИФА, выявляют только антитела, направленные к эпитопам RBD.

Целью работы являлся подбор оптимальных условий для определения ВНА к вирусу SARS-CoV-2 по ингибированию ЦПД в культуре клеток с возможностью как визуального, так и инструментального учёта результата.

Для достижения поставленной цели были поставлены следующие задачи:

- в чувствительной культуре клеток из клинического образца больного COVID-19 изолировать коронавирус SARS-CoV-2;
- путём пассирования в культуре клеток получить лабораторный штамм SARS-CoV-2, вызывающий полную гибель клеток при малых дозах заражения;
- разработать и апробировать методику оценки титра ВНА к SARS-CoV-2 с детекцией результата в колориметрическом метилтетразолиевом (МТТ) тесте.

Материалы и методы

Клинические образцы. Образцы сыворотки крови, полученные от реконвалесцентов COVID-19 и лиц, не болевших (серонегативных в ИФА), и мазок из ротоглотки пациента с подтверждённым диагнозом COVID-19 предоставлены Клинико-диагностическим центром НИИВС им. И.И. Мечникова. Работы с клиническим материалом проводились в соответствии с международными этическими нормами и с добровольного согласия обследуемых.

Вирус и культура клеток. Использовали лабораторный штамм коронавируса SARS-CoV-2 «Dubrovka» (GenBank: MW514307.1). Культивирование вируса проводили на клетках эпителия почки африканской зелёной мартышки Vero CCL81 (ATCC) (далее — клетки Vero). Клетки культивировали при 37°C в питательной среде DMEM на основе буфера Эрла («ПанЭко», Россия) с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки («Gibco»), 300 мкг/мл L-глутамин («ПанЭко»), 40 мкг/мл гентамицин («ПанЭко») в атмосфере с 5% CO₂.

Выявление РНК вируса. Выделение вирусной РНК из клинических и культуральных образцов проводили наборами реагентов «МагноСорб» («ИнтерЛабСервис», Россия) и «РеалБест экстракция 100» («Вектор-Бест», Россия). Вирус SARS-CoV-2 идентифицировали методом ПЦР-РВ с обратной транскрипцией (ОТ) набором реагентов «РеалБест РНК SARS-CoV-2» («Вектор-Бест»). Накопление вируса и репликацию вирусной РНК в культуре клеток контролировали с помощью количественной ОТ-ПЦР-РВ с набором праймеров и зондов к N-гену SARS-CoV-2 [15].

Для постановки реакции ОТ-ПЦР-РВ использовали набор реагентов «2,5x реакционная смесь для ПЦР-РВ с Tag-полимеразой» и обратную транскриптазу MMLV («Синтол»). Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала по 10 пмоль каждого праймера и 5 пмоль зонда, Taq ДНК-полимеразу, 30 ед. обратной транскриптазы. Температурно-временной режим: 45°C — 10 мин (1 цикл); 95°C — 5 мин (1 цикл); 95°C — 5 с, 55°C — 45 с (45 циклов). Реакцию проводили в амплификаторе ДТпрайм

(«ДНК-технология», Россия). Все праймеры и зонды синтезированы в «Синтол».

Секвенирование S-гена SARS-CoV-2. Для секвенирования S-гена SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР амплифицировали фрагменты S-гена, используя набор праймеров собственного дизайна (табл. 1). Реакцию ОТ проводили в реакционной смеси объемом 100 мкл, содержащей буфер для ОТ («Синтол»), 20 пкмоль праймера CSr0, 24 мкл вирусной РНК, 50 ед. ОТ MMLV («Синтол») в режиме: 10 мин при 42°C, 2 мин при 95°C.

Реакцию ПЦР проводили в реакционной смеси объемом 50 мкл, содержащей «LongAmp™ Taq 2X Master Mix» («NEB»), 5 мкл кДНК, по 10 пкмоль праймеров F и R, в режиме: 94°C — 2 мин (1 цикл), 94°C — 60 с, 55°C — 40 с, 65°C — 100 с (40 циклов), 65°C — 10 мин (1 цикл), хранение при 4°C. Полученные ампликоны идентифицировали по подвижности методом электрофореза в 1% агарозном геле, очищали набором реагентов «Cleanup Mini» («Евроген», Россия).

Концентрацию ПЦР-продуктов оценивали спектрофотометрически и передавали с набором праймеров для секвенирования методом Сэнгера в ЗАО «Синтол». «Сборку» полноразмерного S-гена проводили в программе «VectorNTI 11.0.0» («Invitrogen Corp.»).

Культивирование коронавируса SARS-CoV-2. За 3 сут до заражения клетки Vero высевали в куль-

Таблица 1. Праймеры для амплификации и секвенирования S-гена SARS-CoV-2

Table 1. Primers for amplification and sequencing of the SARS-CoV-2 S gene

Праймер Primer	Последовательность Sequence
F CSf0	AGGGGTAAGTCTGTTATGTCTT
CSf1	TTCTTCTTCAGGTTGGACAGC
CSf2	ACATGCACCAGCAACTGTTT
CSf3	GGGCTGAACATGTCAACAAC
CSf4	AACAAATTTACAAAACACCACCAA
CSf5	GAACCAAAAATTGATTGCCA
CSf6	CTTCCCTCAGTCAGCACCTC
CSf7	CTCAATGAGGTTGCCAAGAA
R CSr0	GCTTGTATCGGTATCGTTGCAG
CSr1	TTGTGGTAATAAACACCCAAAAA
CSr2	TTTCCAGTTTGCCCTGGAG
CSr3	CCTGTGCCTGTTAAACCATTG
CSr4	CGCCGAGGAGAATTAGTCTG
CSr5	TCTTGCTTGGTTTTGATGGA
CSr6	GACAAATGGCAGGAGCAGTT
CSr7	CCATGGCCATTTTATATACTGCT

туральные флаконы с вентилируемыми крышками («Corning») площадью 75 см² с кратностью пересева 1 : 5. На 3-и сутки, после достижения 100% монослоя, из флакона удаляли культуральную жидкость и добавляли вирусный материал при MOI = 0,01–0,0001 ТЦД₅₀ на клетку. Адсорбцию вируса проводили в CO₂-инкубаторе в течение 60 мин, затем добавляли поддерживающую среду (DMEM, L-глутамин — 300 мкг/мл, гентамицин — 40 мкг/мл, 1% эмбриональной телячьей сыворотки) и инкубировали при 37°C до проявления ЦПД в атмосфере с 5% CO₂. При появлении ЦПД вирусосодержащую культуральную жидкость собирали, осветляли центрифугированием, аликвотировали и хранили при –80°C.

Титрование вируса по конечной точке ЦПД.

Титр вируса SARS-CoV-2 определяли по конечной точке проявления ЦПД в культуре клеток Vero. Клетки Vero высевали в 96-луночные планшеты с кратностью пересева 1 : 5. Через 3 сут из лунок планшета удаляли ростовую среду, вносили последовательные 10-кратные разведения вируса в поддерживающей среде и инкубировали в течение 5 сут в CO₂-инкубаторе при 37°C. Учёт результатов титрования проводили визуальным путём микроскопического исследования клеточного монослоя на наличие характерного ЦПД на 5-е сутки после заражения (округление и открепление клеток от монослоя). Титр вируса рассчитывали по методике [16] и выражали в lg ТЦД₅₀/мл.

ИФА на заражённых клетках (In-Cell ELISA). Клетки Vero, выращенные до 100% монослоя в 96-луночном планшете, заражали вирусом при MOI = 0,3. Через 24 ч клетки фиксировали в течение 15 мин раствором 8% параформальдегида, приготовленным на фосфатно-солевом буфере (ФСБ; pH 7,2), промывали дважды ФСБ, планшет хранили при 4°C до постановки ИФА. Перед проведением ИФА в лунки планшета вносили на 30 мин по 150 мкл 0,02 М ФСБ, содержащего 1% Тритона X-100, затем на 1 ч вносили блокирующий раствор (0,02 М ФСБ, содержащий 0,09% казеината натрия). После удаления блокирующего раствора в лунки планшета вносили по 100 мкл сыворотки крови в разведении 1 : 100 в 0,02 М ФСБ, содержащем 0,2% бычьего сывороточного альбумина, 0,05% Твин-20 и выдерживали в течение 1 ч при 37°C. После отмывки вносили по 100 мкл конъюгата моноклональных антител мыши к IgG человека с пероксидазой хрена. Повторяли этап инкубации и отмывки, затем вносили по 100 мкл 33 мМ цитратного буферного раствора pH 4,0, содержащего 0,01% перекиси водорода и 0,5 мМ 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. Через 15 мин реакцию останавливали добавлением 50 мкл 2N серной кислоты, измеряли оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения 680 нм.

Определение антител к вирусу в ИФА. Определение антител класса G к RBD-домену коронавируса SARS-CoV-2 проводили с использованием набора реагентов «SARS-CoV-2-ИФА-IgG» (ООО «МедипалТех»).

За титр антител к SARS-CoV-2 принимали последнее разведение, при котором значение ОП образца было выше, чем порог отсечения в каждом исследовании.

МТТ-тест. Выживаемость клеток Vero, заражённых вирусом, оценивали с помощью витального красителя метилтиазолилтетразолия бромид (МТТ). На 5-е сутки после заражения в лунки с клетками 96-луночного планшета добавляли по 20 мкл раствора МТТ, 5 мг/мл («ПанЭко») и инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в течение 2 ч. Далее культуральную жидкость отбирали и добавляли в лунки по 100 мкл диметилсульфоксида («Sigma-Aldrich») в каждую лунку. С помощью планшетного спектрофотометра определяли ОП каждой лунки при 530 нм с учётом фоновых значений при 620 нм. Выживаемость клеток рассчитывали по формуле:

$$\text{Выживаемость} = \frac{\text{ОП}_{530} \text{ опытной пробы}}{\text{ОП}_{530} \text{ клеточного контроля}} \times 100\%,$$

где ОП₅₃₀ опытной пробы — среднее значение ОП₅₃₀ в лунках с заражёнными клетками; ОП₅₃₀ клеточного контроля — среднее значение ОП₅₃₀ в лунках с незаражённой клеточной культурой.

Реакция нейтрализации. Определение титра ВНА к SARS-CoV-2 проводили, как описано в работе [17], с модификациями. Образцы сывороток аликвотировали по 100 мкл и хранили при –20°C. Перед постановкой реакции нейтрализации (РН) сыворотку размораживали, прогревали при 56°C в течение 30 мин, готовили последовательные двукратные разведения поддерживающей средой. Разведения сывороток смешивали с равным объёмом вирусного материала SARS-CoV-2 в титре 2 × 10³ ТЦД₅₀/мл и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 1 ч. Из 96-луночного планшета с 3-дневным монослоем клеток Vero удаляли среду, в лунки вносили смесь вируса и сыворотки в 4 повторях по 100 мкл (доза вируса — 100 ТЦД₅₀ на лунку) согласно схеме (табл. 2) и инкубировали в течение 5 сут при 37°C в атмосфере с 5% CO₂.

Помимо исследуемых образцов, в РН предусматривали следующие контроли: клеточный контроль (КК — незаражённая клеточная культура), вирусный контроль (ВК — клетки, заражённые рабочим разведением вируса), контроль сыворотки (КС — сыворотка в разведении 1 : 20), контроль дозы (КД — пятикратные разведения вируса).

Учёт результата РН проводили визуальным путём микроскопического исследования клеток либо спектрофотометрически в колориметрическом тесте

Таблица 2. Схема расположения образцов в 96-луночном планшете при постановке РН**Table 2.** Arrangement of samples in the 96-well plate during NT

Разведение сыворотки Serum dilution	Сыворотка 1 / Serum-1				Сыворотка 2 / Serum-2				Контроли / Controls			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 : 20									КД / DC			
1 : 40												
1 : 80												
1 : 160												
1 : 320								КК-1 / CS-1		КК-2 / CS-2		
1 : 640								КК / CC		ВК / VC		
1 : 1280												
1 : 2560												

МТТ. В целях защиты персонала перед измерением ОП планшет в открытом виде с разных сторон обрабатывали в течение 5 мин ультрафиолетом в боксе микробиологической безопасности. При визуальном учёте нейтрализующим титром сыворотки считали обратное значение её последнего разведения, в котором признаков ЦПД не обнаруживалось в 2 или более лунках. В тесте МТТ учёт нейтрализующего титра проводили спектрофотометрически и считали по последнему разведению, при котором показатель среднего значения ОП₅₃₀₋₆₂₀ (далее — ОП₅₃₀) был равен или превышал значения порогового показателя (ПП), определённого по формуле:

$$ПП = \frac{ОП_{530} КК - ОП_{530} ВК}{2},$$

где ОП₅₃₀ КК — среднее значение ОП₅₃₀ в контрольных лунках с незаражённой клеточной культурой; ОП₅₃₀ ВК — среднее значение ОП₅₃₀ в контрольных лунках, содержащих рабочее разведение вируса.

Значения контрольных показателей учитывали следующим образом: КК — клеточный монослой в контрольных лунках должен быть сохранён полностью. ВК — полная дегенерация монослоя клеток в результате ЦПД вируса. Значения ОП₅₃₀ ВК должны быть не выше 0,2, а отношение ОП₅₃₀ КК/ОП₅₃₀ ВК должно быть не менее 8.

Статистическая обработка данных. Статистическую значимость разницы титров антител, учтённых разными методами, оценивали с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Достоверной считали разницу при $p < 0,05$ и $p < 0,001$. Качественную оценку показателей проводили по шкале Чеддока, обработку результатов — с помощью программ «Microsoft Excel», «GraphPadPrism».

Требования к безопасности работ. Все работы с вирусом SARS-CoV-2 проводили в условиях, отвечающих требованиям безопасности работ с патогенными биологическими объектами II группы патогенности. Сотрудники, работающие с вирусом, прошли инструктаж по технике безопасности

и имеют действующее удостоверение о повышении квалификации по программе «Бактериология. Вирусология. Биологическая безопасность», выданное ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.

Результаты

Вирус SARS-CoV-2, используемый для постановки РН, получали путём изоляции вируса в культуре клеток Vero из клинического образца. С этой целью использовали мазок из ротоглотки пациентки в возрасте 61 года, в котором методом ОТ-ПЦР-РВ выявлено высокое содержание РНК вируса SARS-CoV-2 (8,82 lg копий/мл). Впоследствии у пациентки развилось заболевание с клиническими признаками COVID-19: кашель, одышка, фебрильная температура, потеря вкуса и обоняния. Компьютерная томография органов грудной полости показала характерное уплотнение лёгочной ткани с общей площадью поражения с обеих сторон 50%. Поставлен диагноз «COVID-19, вирус идентифицирован (U07.1, МКБ 10), внебольничная двусторонняя полисегментарная вирусная пневмония».

Клиническим материалом заразили культуру клеток Vero и инкубировали её в CO₂-инкубаторе в течение 5 сут до появления признаков ЦПД, проявляющегося в округлении клеток, после чего проводили следующий пассаж. С целью идентификации вируса материал, полученный на разных пассажных уровнях, анализировали на наличие РНК SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР-РВ с праймерами к N-гену [15]. На 2, 7, 14 и 21-м пассажах в культуральной жидкости выявлена РНК коронавируса SARS-CoV-2 в высокой концентрации (9; 9,7; 9,2 и 9,9 lg копий/мл соответственно). Методом In-Cell ELISA установлено, что нативный вирусный антиген, полученный в заражённых клетках Vero, реагировал с сыворотками реконвалесценто́в COVID-19 и не реагировал с сыворотками не болевших людей.

Таксономическая принадлежность изолята к виду *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus* и коронавирусу SARS-CoV-2 (кла-

да GH) была установлена путём секвенирования S-гена (GenBank: MW161041.1) и полного генома (GenBank: MW514307.1) с последующим филогенетическим анализом (рис. 2). Выделенному штамму вируса присвоено название «Dubrovka». Последовательность S-гена штамма Dubrovka имела 99,2% сходство со штаммом Wuhan-Hu-1, ставшим причиной эпидемии в г. Ухане (КНР) в декабре 2019 г. Особенностью штамма Dubrovka является делеция в S-гене размером в 27 нт (кодирует в S-белке синтез 9 аминокислот с 68 по 76 а.о. — YMSLGPMVL), по сравнению с S-геном штамма Wuhan-Hu-1, чем и объясняется относительно высокий уровень различий (0,8%) между этими штаммами. Важно отметить, что упомянутая делеция была выявлена в геноме штамма Dubrovka после 1-го пассажа в культуре клеток Vero и сохранялась на 40-м пассажном уровне. В GenBank обнаружено только 2 штамма SARS-CoV-2, выявленных в феврале и марте 2020 г. в Бельгии и Тайване (GenBank: MW368439.1, MT479224.1) и имеющих аналогичную делецию.

При пассировании вируса в культуре клеток Vero титр вируса возрастал (от 4,3 lg ТЦД₅₀/мл на 2-м пассаже до 9,0 lg ТЦД₅₀/мл на 30-м пассаже), а ЦПД становилось всё более выраженным. При визуальном учёте доля погибших клеток на 5-е сутки после заражения повышалась с увеличением пассажного уровня (рис. 3).

В МТТ-тесте показано, что если при заражении вирусом 2-го пассажа выживаемость клеток Vero составляла 92%, то уже к 14-му пассажу достигала минимального уровня (2–4%) (рис. 4).

Таким образом, адаптированный к культуре клеток Vero штамм SARS-CoV-2 при малых дозах заражения вызывал выраженное ЦПД, которое без труда можно детектировать при микроскопическом исследовании монослоя. На основе созданной индикаторной системы была отработана и апробирована РН. Изучена зависимость значения титра ВНА от дозы заражения клеток. С этой целью сыворотка реконвалесцента COVID-19 с высоким титром антител к вирусу SARS-CoV-2 была исследована в РН при 4 дозах заражения: 200, 100, 50 и 25 ТЦД₅₀

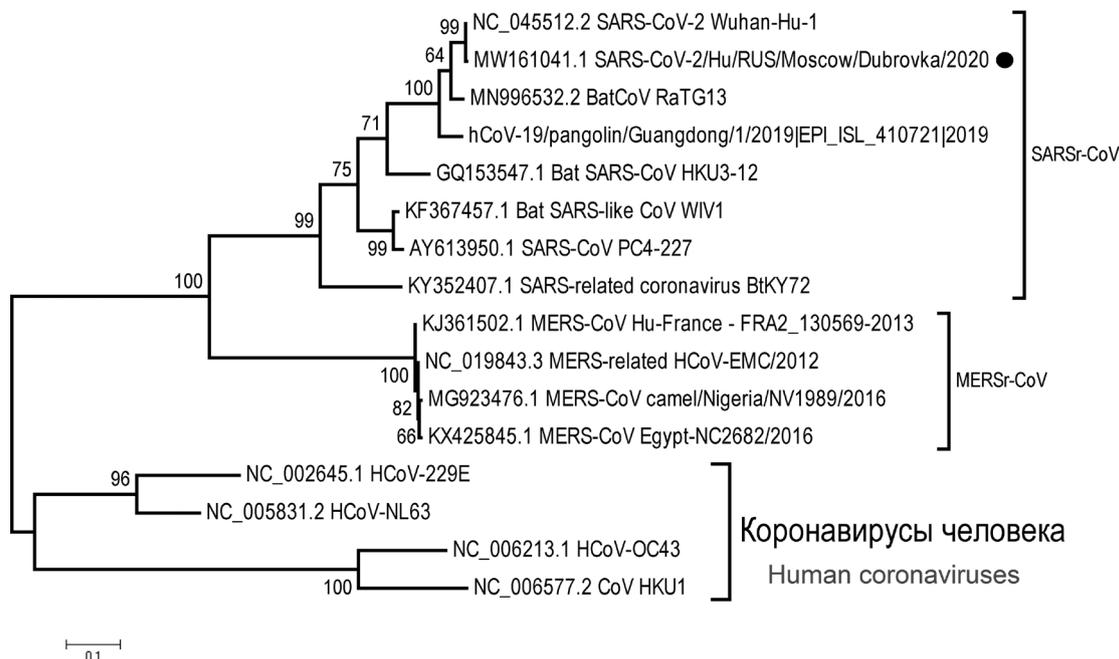


Рис. 2. Дендрограмма, построенная на основе сравнения нуклеотидных последовательностей S-гена (3794 н.) штамма SARS-CoV-2 Dubrovka, коронавирусов, патогенных для человека, и филогенетически родственных им штаммов коронавирусов животных.

В описании штаммов указан идентификационный номер GenBank или GISAID и название штамма. Дерево построено методом максимального правдоподобия и трехпараметрической эволюционной модели «Tamura-Nei» в программе «MEGA 5». Цифры над узлами дендрограммы — доля (в %) из 1000 альтернативных деревьев, поддерживающих данную группу. Штамм Dubrovka отмечен значком •. SARSr-CoV — представители вида Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus; MERSr-CoV — представители вида Middle East respiratory syndrome-related coronavirus.

Fig. 2. The phylogenetic tree built on the comparison of nucleotide sequences of the S-gene (3794) of the SARS-CoV-2 Dubrovka strain, coronaviruses pathogenic for humans and phylogenetically related coronavirus strains of animals.

The description of strains includes the GenBank or GISAID strain identifier and the name of a strain. The tree was built with the maximum likelihood method and Tamura-Nei three-parameter evolution model by using the MEGA 5 program. The numbers above the tree nodes show the proportion (%) of 1,000 alternative trees supporting this group. The Dubrovka strain is marked by the • sign.

SARSr-CoV — representatives of the species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus;
MERSr-CoV — representatives of the species Middle East respiratory syndrome-related coronavirus.

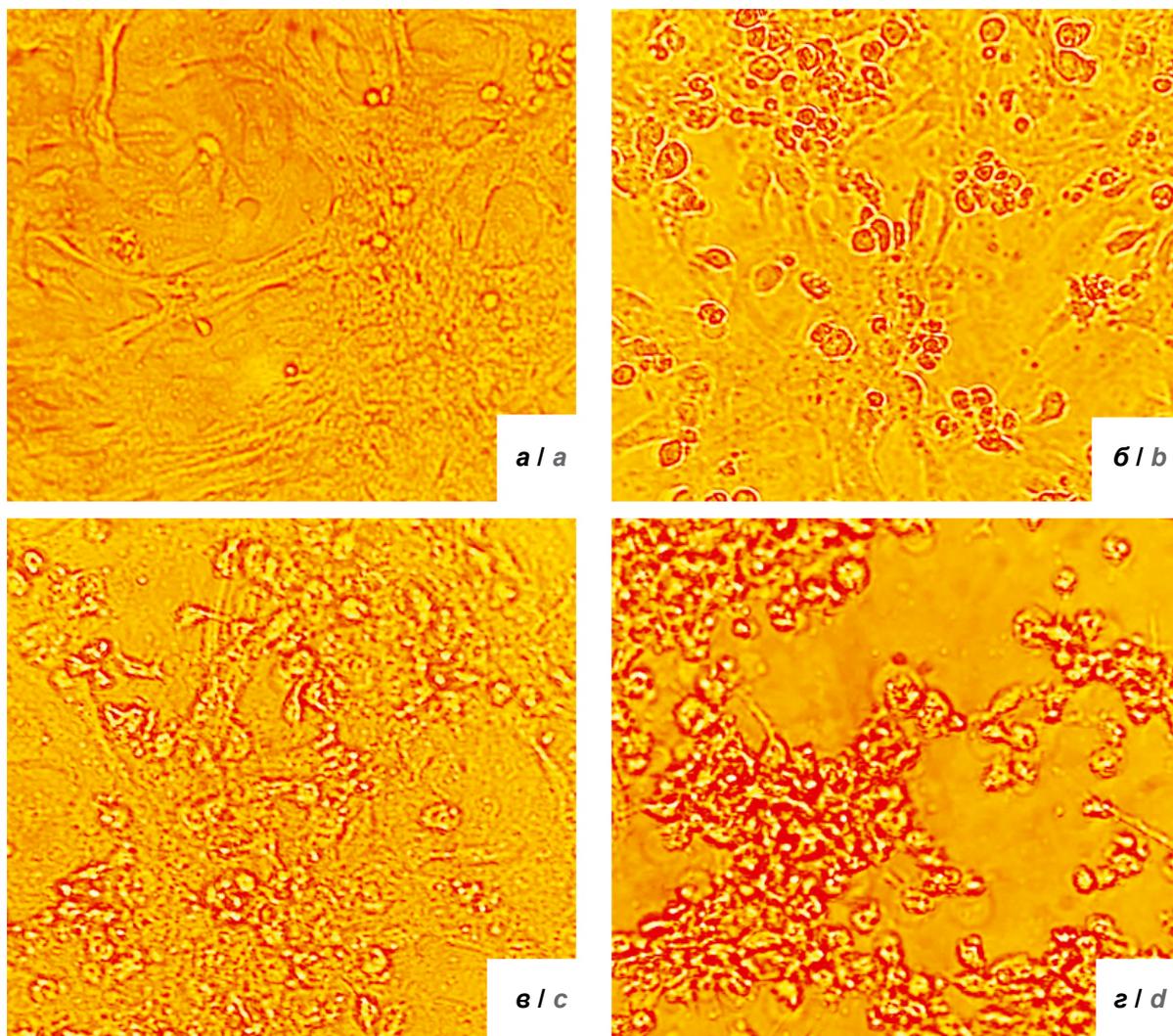


Рис. 3. ЦПД в клетках Vero на 5-е сутки после заражения вирусом разных пассажных уровней.

a — незаражённые клетки; *b* — 2-й пассаж; *в* — 7-й; *г* — 21-й.

Fig. 3. CPE in Vero cells on day 5 post-infection with the virus of different passage levels.

a — uninfected cells; *b* — 2nd passage; *c* — 7th passage; *d* — 21st passage.

на лунку. В результате значения титра ВНА закономерно распределились в обратной зависимости от дозы заражения и составили 160, 320, 640 и 1280 соответственно. В дальнейшей работе мы использовали в РН дозу 100 ТЦД₅₀ на лунку, поскольку в известных нам научных публикациях применялась эта доза [16, 18, 19].

Далее было проведено исследование в РН сывороток крови, охарактеризованных ранее по содержанию антител к SARS-CoV-2. Было исследовано 46 образцов, содержащих IgG антитела к вирусу в диапазоне разведений (титр) от 1 : 200 до >1 : 3200 (рис. 5, *a*). Для контроля специфичности также исследовали 20 сывороток пациентов, не содержащих антитела к SARS-CoV-2. Титры ВНА достоверно коррелировали (Спирмен $r = 0,714$; $p < 0,001$) с титрами, полученными в ИФА. Все сыворотки, охарактеризованные как отрицательные в ИФА, также

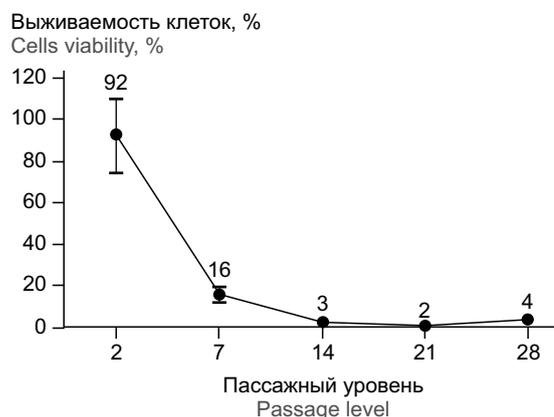


Рис. 4. Выживаемость клеток Vero на 5-е сутки после заражения вирусом в зависимости от пассажного уровня вируса, MOI = 0,0001.

Fig. 4. Viability of Vero cells on day 5 post-infection depending on a passage level of the virus, MOI = 0.0001.

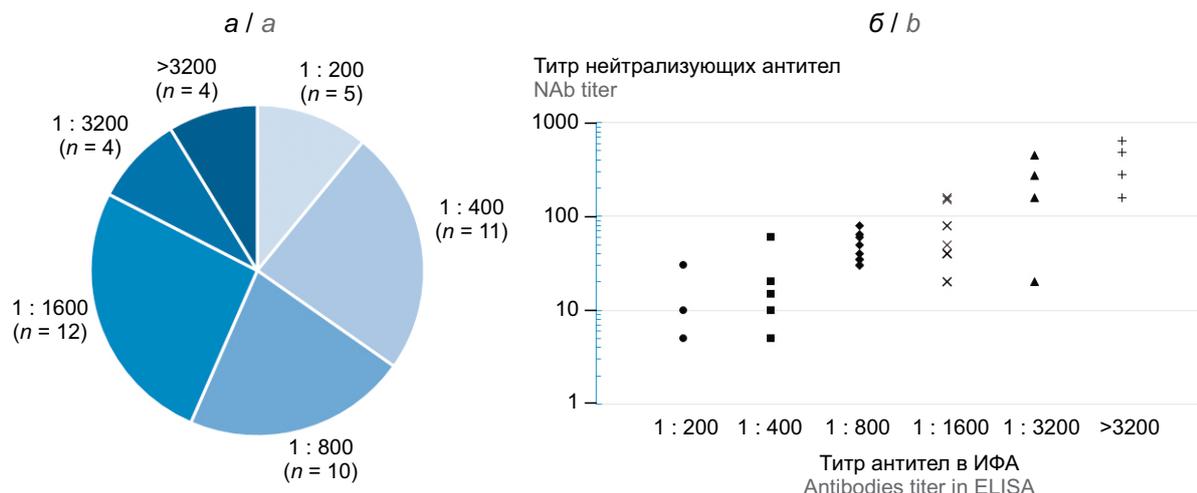


Рис. 5. Распределение сывороток, в которых обнаружены IgG-антитела к SARS-CoV-2, по титрам (предельному разведению сыворотки; а) и корреляционная связь между титрами ВНА и суммарных антител к SARS-CoV-2 в сыворотках крови реконвалесцентов COVID-19 ($n = 46$; б).

Спирмен $r = 0,714$; $p < 0,001$.

Fig. 5. Distribution of sera with detected IgG antibodies against SARS-CoV-2 by titers (the limiting dilution of the serum; а) and correlative relationship between the Nab titers and total antibodies against SARS-CoV-2 in the COVID-19 convalescent sera ($n = 46$; б).

Spearman's $r = 0.714$; $p < 0.001$.

показали полное отсутствие вируснейтрализации. Более половины сывороток с титрами в диапазоне от 1 : 200 до 1 : 400 обладали нейтрализующей активностью; только в одной сыворотке с титром 1 : 800 ВНА обнаружены не были, тогда как все сыворотки с титрами от 1 : 1600 до >1 : 3200 обладали нейтрализующей активностью (рис. 5, б).

Далее были отработаны условия спектрофотометрической детекции результатов РН в тесте МТТ. При постановке РН с последующим окрашиванием МТТ визуальное исследование планшет с

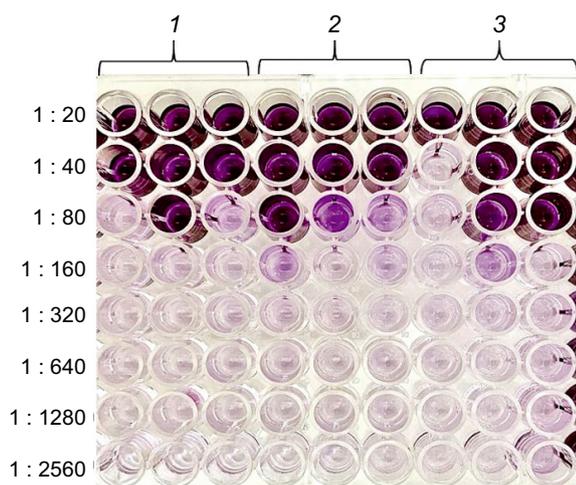


Рис. 6. МТТ-тест для учёта РН.

Цифры 1, 2, 3 сверху означают номер сыворотки; слева указаны значения разведений сывороток.

Fig. 6. MTT assay for NT assessment.

Numbers 1, 2, and 3 at the top mean the serum reference number; the values of serum dilutions are shown on the left.

МТТ показало, что лунки с разведениями сывороток, содержащими защитный титр ВНА, окрашивались в темно-фиолетовый цвет, что полностью согласовывалось с микроскопической оценкой состояния клеток. С увеличением степени разведения сывороток окраска в лунках исчезала, что свидетельствует о гибели клеток при недостаточной для нейтрализации вируса концентрации ВНА. В МТТ-тесте отношение $ОП_{530}$ в лунках с незаражёнными SARS-CoV-2 клетками (КК) к $ОП_{530}$ в заражённых клетках (ВК) в среднем составляло 28 ± 16 , что позволяет надёжно оценивать вирус-опосредованное ЦПД. На рис. 6 представлен пример детекции результатов РН в МТТ-тесте, позволяющий оценить титр ВНА в сыворотке 1 (1 : 40), сыворотках 2 и 3 (1 : 80).

Всего в РН со спектрофотометрической детекцией в МТТ-тесте было исследовано 30 сывороток. В 16 сыворотках реконвалесцентов COVID-19 были выявлены ВНА к SARS-CoV-2 в разных титрах, тогда как 14 серонегативных в ИФА сывороток не содержали ВНА. Данные, полученные при визуальном микроскопическом учёте и в МТТ-тесте (табл. 3), достоверно коррелировали, коэффициент корреляции по Спирмену (r) составил 0,963 ($p < 0,05$), что соответствует весьма высокой связи между признаками по шкале Чеддока.

Обсуждение

Определение нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 имеет решающее значение для понимания возможного защитного иммунного ответа. В настоящем исследовании разработаны методичес-

Таблица 3. Сравнение результатов РН при микроскопическом учёте и МТТ-тесте (сыворотки реконвалесценто́в COVID-19)

Table 3. Comparison of NT results from microscopic examination and MTT assay (COVID-19 convalescent sera)

Номер сыворотки Serum number	Титр ВНА / NAb titer	
	микроскопический учет microscopic accounting	МТТ-тест MTT-test
1	640	640
2	640	640
3	20	40
4	20	40
5	20	20
6	20	20
7	40	40
8	20	40
9	20	0
10	80	40
11	40	80
12	80	80
13	320	320
14	1280	1280
15	160	160
16	80	80

кие подходы к оценке титра ВНА к SARS-CoV-2, в основе которых лежит РН с микроскопической либо спектрофотометрической оценкой выживаемости клеток Vero. Оба этих подхода к учёту результата РН возможны при условии получения выраженного ЦПД вируса в культуре клеток.

Вирус SARS-CoV-2, полученный на ранних пассажных уровнях (от 2 до 7), при заражении культуры клеток приводил к округлению и частичной гибели клеток при высоких дозах заражения, тогда как при низких дозах ЦПД было невыраженным, что затрудняет визуальный учёт ЦПД. Длительная адаптация вируса к культуре клеток Vero позволила получить выраженное ЦПД, что не только снижает субъективизм при микроскопическом учёте результата, но и позволяет успешно учитывать результаты РН в колориметрическом тесте МТТ, визуально оценивая окрашенные лунки планшета, либо спектрофотометрически.

Инструментальный учёт обеспечивает получение результата в числовом формате, что позволяет проводить программную статистическую обработку результата и, что немаловажно, снижает нагрузку на органы зрения работника. Преимуществом МТТ-теста является его доступность в использовании: результаты теста можно учитывать с помощью планшетного спектрофотометра, что не требует дорогостоящего оборудования и реагентов для ис-

пользования иных методов определения жизнеспособности клеток [20–22].

В колориметрическом тесте МТТ живые клетки восстанавливают жёлтый раствор метилтиазолилтетразолия бромидом с помощью НАДФ-Н-зависимой оксидоредуктазной системы, что приводит к образованию нерастворимых фиолетовых кристаллов формазана, в то время как в мертвых клетках этого не происходит [21, 22]. В связи с этим МТТ-тест имеет преимущество перед методом оценки выживаемости клеток, основанным на окрашивании клеток кристаллическим фиолетовым, который неизбирательно окрашивает как живые, так и мёртвые клетки [23].

В работе продемонстрирована возможность снижения заражающей дозы вируса при постановке РН в 4 раза — со 100 до 25 ТЦД₅₀ на лунку, что повышает чувствительность РН в 4 раза. Следует отметить, что штамм Dubrovka, хорошо адаптированный к культуре клеток, обеспечивает получение выраженного ЦПД и при более низких дозах заражения (менее 25 ТЦД₅₀ на лунку), что повышает ресурс увеличения чувствительности РН.

Малые разведения исследуемых сывороток (1 : 20 и 1 : 40) могут проявлять цитотоксичность, что снижает точность оценки титра ВНА. Важным условием получения надёжного результата РН, особенно при учёте результатов в тесте МТТ, является взятие крови натощак, что минимизирует вероятность токсического эффекта компонентов сывороток на клетки, и обязательное применение контроля сыворотки (внесение в клетки сыворотки в разведении 1 : 20 без вируса).

Заключение

На основе адаптированного к культуре клеток Vero вируса SARS-CoV-2 разработана система оценки титра ВНА, позволяющая учитывать результат как микроскопически, так и с помощью планшетного спектрофотометра в МТТ-тесте. Колориметрический учёт результата позволяет проводить статистическую обработку получаемых данных, что снижает субъективизм при учёте результата и нагрузку на органы зрения, возникающую при микроскопическом учёте. Таким образом, МТТ-тест представляет собой эффективный, производительный подход к автоматизированному учёту результатов РН. Являясь витальным красителем, МТТ выявляет только живые клетки, что повышает надёжность получаемых результатов по сравнению с другими красителями. Разработанные методические подходы имеют большой потенциал практического применения при определении напряжённости противовирусного иммунитета (естественного и поствакцинального), оценке специфической активности плазмы доноров — реконвалесценто́в COVID-19, применяемой для экстренной профилактики и лечения заболева-

ния, а также при испытаниях вакцин и диагностических тест-систем в качестве «золотого стандарта» определения ВНА.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Deeks J.J., Dinnes J., Takwoingi Y., Davenport C., Spijker R., Taylor-Phillips S., et al. Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2020; 6(6): CD013652. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013652>
- Mekonnen D., Mengist H.M., Derby A., Nibret E., Munshea A., He H., et al. Diagnostic accuracy of serological tests and kinetics of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 antibody: A systematic review and meta-analysis. *Rev. Med. Virol.* 2020; e2181. <https://doi.org/10.1002/rmv.2181>
- Zost S.J., Gilchuk P., Case J.B., Binshtein E., Chen R.E., Nkolola J.P., et al. Potently neutralizing and protective human antibodies against SARS-CoV-2. *Nature.* 2020; 584(7821): 443–9. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2548-6>
- Rogers T.F., Zhao F., Huang D., Beutler N., Burns A., He W.T., et al. Isolation of potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and protection from disease in a small animal model. *Science.* 2020; 369(6506): 956–63. <https://doi.org/10.1126/science.abc7520>
- Chi X., Yan R., Zhang J., Zhang G., Zhang Y., Hao M., et al. A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the Spike protein of SARS-CoV-2. *Science.* 2020; 369(6504): 650–5. <https://doi.org/10.1126/science.abc6952>
- Brown B.L., McCullough J. Treatment for emerging viruses: Convalescent plasma and COVID-19. *Transfus. Apher. Sci.* 2020; 59(3): 102790. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2020.102790>
- Баклаушев В.П., Аверьянов А.В., Сотникова А.Г., Перкина А.С., Иванов А.В., Юсубалиева Г.М. и др. Предварительные итоги исследования безопасности и эффективности плазмы реконвалесцентов в терапии COVID-19. *Клиническая практика.* 2020; 11(2): 38–50. <https://doi.org/10.17816/clinpract35168>
- Vanderheiden A., Edara V.V., Floyd K., Kauffman R.C., Mantus G., Anderson E., et al. Development of a rapid focus reduction neutralization test assay for measuring SARS-CoV-2 neutralizing antibodies. *Curr. Protoc. Immunol.* 2020; 131(1): e116. <https://doi.org/10.1002/cpim.116>
- Tan C.W., Chia W.N., Qin X., Liu P., Chen M.I., Tiu C., et al. A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2-spike protein-protein interaction. *Nat. Biotechnol.* 2020; 38(9): 1073–8. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0631-z>
- Meyer B., Reimerink J., Torriani G., Brouwer F., Godeke G.J., Yerly S., et al. Validation and clinical evaluation of a SARSCoV-2 surrogate virus neutralisation test (sVNT). *Emerg. Microbes Infect.* 2020; 9(1): 2394–403. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1835448>
- Nie J., Li Q., Wu J., Zhao C., Hao H., Liu H., et al. Establishment and validation of a pseudovirus neutralization assay for SARS-CoV-2. *Emerg. Microbes Infect.* 2020; 9(1): 680–6. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1743767>
- Schmidt F., Weisblum Y., Muecksch F., Hoffmann H.H., Michailidis E., Lorenzi J.C.C., et al. Measuring SARS-CoV-2 neutralizing antibody activity using pseudotyped and chimeric viruses. *J. Exp. Med.* 2020; 217(11): e20201181. <https://doi.org/10.1084/jem.20201181>
- Brouwer P.J.M., Caniels T.G., van der Straten K., Snitselaar J.L., Aldon Y., Bangaru S., et al. Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability. *Science.* 2020; 369(6504): 643–50. <https://doi.org/10.1126/science.abc5920>
- Liu L., Wang P., Nair M.S., Yu J., Rapp M., Wang Q., et al. Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature.* 2020; 584(7821): 450–6. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2571-7>
- Chan J.F., Yip C.C., To K.K., Tang T.H., Wong S.C., Leung K.H., et al. Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/Hel real-time reverse transcription-PCR assay validated in vitro and with clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2020; 58(5): e00310-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00310-20>
- Ramakrishnan M.A. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J. Virol.* 2016; 5(2): 85–6. <https://doi.org/10.5501/wjv.v5.i2.85>
- Gao Q., Bao L., Mao H., Wang L., Xu K., Yang M., et al. Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. *Science.* 2020; 369(6499): 77–81. <https://doi.org/10.1126/science.abc1932>
- Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., Tukhvatulin A.I., Shcheblyakov D.V., Dzharullaeva A.S., et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet.* 2020; 396(10255): 887–97. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31866-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31866-3)
- Chan J.F., Zhang A.J., Yuan S., Poon V.K., Chan C.C., Lee A.C., et al. Simulation of the clinical and pathological manifestations of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in a golden Syrian hamster model: implications for disease pathogenesis and transmissibility. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(9): 2428–46. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa325>
- Haddad E.E., Whitfill C.E., Ricks C.A., Fredericksen T., Rowe D., Owen L., et al. Adaptation of the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay for the determination of virus-neutralizing antibodies using the virus-neutralization assay. *Avian Dis.* 1994; 38(4): 755–61.
- Müller J.A., Harms M., Schubert A., Mayer B., Jansen S., Herbeuval J.P., et al. Development of a high-throughput colorimetric Zika virus infection assay. *Med. Microbiol. Immunol.* 2017; 206(2): 175–85. <https://doi.org/10.1007/s00430-017-0493-2>
- Heldt C.L., Hernandez R., Mudiganti U., Gurgel P.V., Brown D.T., Carbonell R.G. A colorimetric assay for viral agents that produce cytopathic effects. *J. Virol. Methods.* 2006; 135(1): 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.01.022>
- Feoktistova M., Geserick P., Leverkus M. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2016; 2016(4): pdb.prot087379. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>

REFERENCES

- Deeks J.J., Dinnes J., Takwoingi Y., Davenport C., Spijker R., Taylor-Phillips S., et al. Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2020; 6(6): CD013652. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013652>
- Mekonnen D., Mengist H.M., Derby A., Nibret E., Munshea A., He H., et al. Diagnostic accuracy of serological tests and kinetics of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 antibody: A systematic review and meta-analysis. *Rev. Med. Virol.* 2020; e2181. <https://doi.org/10.1002/rmv.2181>
- Zost S.J., Gilchuk P., Case J.B., Binshtein E., Chen R.E., Nkolola J.P., et al. Potently neutralizing and protective human anti-

- bodies against SARS-CoV-2. *Nature*. 2020; 584(7821): 443–9. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2548-6>
4. Rogers T.F., Zhao F., Huang D., Beutler N., Burns A., He W.T., et al. Isolation of potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and protection from disease in a small animal model. *Science*. 2020; 369(6506): 956–63. <https://doi.org/10.1126/science.abc7520>
 5. Chi X., Yan R., Zhang J., Zhang G., Zhang Y., Hao M., et al. A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the Spike protein of SARS-CoV-2. *Science*. 2020; 369(6504): 650–5. <https://doi.org/10.1126/science.abc6952>
 6. Brown B.L., McCullough J. Treatment for emerging viruses: Convalescent plasma and COVID-19. *Transfus. Apher. Sci.* 2020; 59(3): 102790. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2020.102790>
 7. Baklaushev V.P., Aver'yanov A.V., Sotnikova A.G., Perkina A.S., Ivanov A.V., Yusubalieva G.M., et al. Safety and efficacy of convalescent plasma for COVID-19: the preliminary results of a clinical trial. *Klinicheskaya praktika*. 2020; 11(2): 38–50. <https://doi.org/10.17816/clinpract35168> (in Russian)
 8. Vanderheiden A., Edara V.V., Floyd K., Kauffman R.C., Mantus G., Anderson E., et al. Development of a rapid focus reduction neutralization test assay for measuring SARS-CoV-2 neutralizing antibodies. *Curr. Protoc. Immunol.* 2020; 131(1): e116. <https://doi.org/10.1002/cpim.116>
 9. Tan C.W., Chia W.N., Qin X., Liu P., Chen M.I., Tiu C., et al. A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2-spike protein-protein interaction. *Nat. Biotechnol.* 2020; 38(9): 1073–8. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0631-z>
 10. Meyer B., Reimerink J., Torriani G., Brouwer F., Godeke G.J., Yerly S., et al. Validation and clinical evaluation of a SARS-CoV-2 surrogate virus neutralisation test (sVNT). *Emerg. Microbes Infect.* 2020; 9(1): 2394–403. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1835448>
 11. Nie J., Li Q., Wu J., Zhao C., Hao H., Liu H., et al. Establishment and validation of a pseudovirus neutralization assay for SARS-CoV-2. *Emerg. Microbes Infect.* 2020; 9(1): 680–6. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1743767>
 12. Schmidt F., Weisblum Y., Muecksch F., Hoffmann H.H., Michailidis E., Lorenzi J.C.C., et al. Measuring SARS-CoV-2 neutralizing antibody activity using pseudotyped and chimeric viruses. *J. Exp. Med.* 2020; 217(11): e20201181. <https://doi.org/10.1084/jem.20201181>
 13. Brouwer P.J.M., Caniels T.G., van der Straten K., Snitselaar J.L., Aldon Y., Bangaru S., et al. Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability. *Science*. 2020; 369(6504): 643–50. <https://doi.org/10.1126/science.abc5902>
 14. Liu L., Wang P., Nair M.S., Yu J., Rapp M., Wang Q., et al. Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature*. 2020; 584(7821): 450–6. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2571-7>
 15. Chan J.F., Yip C.C., To K.K., Tang T.H., Wong S.C., Leung K.H., et al. Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/Hel real-time reverse transcription-PCR assay validated in vitro and with clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2020; 58(5): e00310-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00310-20>
 16. Ramakrishnan M.A. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J. Virol.* 2016; 5(2): 85–6. <https://doi.org/10.5501/wjv.v5.i2.85>
 17. Gao Q., Bao L., Mao H., Wang L., Xu K., Yang M., et al. Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. *Science*. 2020; 369(6499): 77–81. <https://doi.org/10.1126/science.abc1932>
 18. Logunov D.Y., Dolzhenko I.V., Zubkova O.V., Tukhvatulin A.I., Shcheblyakov D.V., Dzharullaeva A.S., et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet*. 2020; 396(10255): 887–97. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31866-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31866-3)
 19. Chan J.F., Zhang A.J., Yuan S., Poon V.K., Chan C.C., Lee A.C., et al. Simulation of the clinical and pathological manifestations of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in a golden Syrian hamster model: implications for disease pathogenesis and transmissibility. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(9): 2428–46. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa325>
 20. Haddad E.E., Whitfill C.E., Ricks C.A., Fredericksen T., Rowe D., Owen L., et al. Adaptation of the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay for the determination of virus-neutralizing antibodies using the virus-neutralization assay. *Avian Dis.* 1994; 38(4): 755–61.
 21. Müller J.A., Harms M., Schubert A., Mayer B., Jansen S., Herbeuval J.P., et al. Development of a high-throughput colorimetric Zika virus infection assay. *Med. Microbiol. Immunol.* 2017; 206(2): 175–85. <https://doi.org/10.1007/s00430-017-0493-2>
 22. Heldt C.L., Hernandez R., Mudiganti U., Gurgel P.V., Brown D.T., Carbonell R.G. A colorimetric assay for viral agents that produce cytopathic effects. *J. Virol. Methods*. 2006; 135(1): 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.01.022>
 23. Feoktistova M., Geserick P., Leverkus M. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2016; 2016(4): pdb.prot087379. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>

Информация об авторах

Грачева Анастасия Вячеславовна — м.н.с. лаб. молекулярной вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8428-4482>

Корчевая Екатерина Романовна — м.н.с. лаб. молекулярной вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6417-3301>

Кудряшова Александра Михайловна — н.с. лаб. медицинской биотехнологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2575-0898>

Борисова Ольга Васильевна — к.х.н., зав. лаб. медицинской биотехнологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7664-2945>

Петруша Ольга Александровна — м.н.с. лаб. молекулярной вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5022-7962>

Information about the authors

Anastasiia V. Gracheva — junior researcher, Laboratory of molecular virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8428-4482>

Ekaterina R. Korchevaya — junior researcher, Laboratory of molecular virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6417-3301>

Alexandra M. Kudryashova — researcher, Laboratory of medical biotechnology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2575-0898>

Olga V. Borisova — Cand. Sci. (Chem.), Head, Laboratory of medical biotechnology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7664-2945>

Olga A. Petrusha — junior researcher, Laboratory of molecular virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5022-7962>

Смирнова Дарья Ильинична — м.н.с. лаб. молекулярной вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7325-0834>

Чернышова Ирина Николаевна — с.н.с. лаб. биосинтеза иммуноглобулинов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5053-2433>

Свитич Оксана Анатольевна — д.м.н., проф., член-корр. РАН, зав. лаб. молекулярной иммунологии, директор НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>

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

Файзулов Евгений Бахтиерович[✉] — к.б.н., зав. лаб. молекулярной вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, faizuloev@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7385-5083>

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

Статья поступила в редакцию 24.02.2021;
принята к публикации 07.04.2021;
опубликована 25.05.2021

Daria I. Smirnova — junior researcher, Laboratory of molecular virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7325-0834>

Irina N. Chernyshova — senior researcher, Laboratory biosynthesis of immunoglobulins, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5053-2433>

Oksana A. Svitich — D. Sci. (Med.), Prof., Corresponding Member of RAS, Head, Laboratory of molecular immunology, Director, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>

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

Evgeny B. Faizuloev[✉] — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of molecular virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, faizuloev@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7385-5083>

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.

The article was submitted 24.02.2021;
accepted for publication 07.04.2021;
published 25.05.2021

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-120>

Дополнительный резервуар госпитальных микроорганизмов в медицинских организациях

Чезганова Е.А.¹, Ефимова О.С.², Сахарова В.М.³, Ефимова А.Р.⁴,
Созинов С.А.², Исмагилов З.Р.², Брусина Е.Б.¹

¹ Кемеровский государственный медицинский университет, Кемерово, Россия;

² Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук, Кемерово, Россия;

³ Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово, Россия;

⁴ Центр гигиены и эпидемиологии в Кемеровской области, Кемерово, Россия

Введение. Подавляющее большинство инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), развиваются в результате колонизации локусов пациентов госпитальными штаммами возбудителей.

Цель исследования — изучение дополнительного резервуара микроорганизмов в медицинских организациях.

Материалы и методы. Исследовано 28 образцов больничной пыли методами сканирующей электронной микроскопии и динамического рассеяния света, энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии и высокотемпературного каталитического окисления, 97 проб — полимеразной цепной реакцией и на бактериологическом анализаторе «VITEK®2 Compact» с целью исследования микробного разнообразия. Проведены индикация биологических плёнок ($n = 29$) с помощью каталазного индикатора, определение общего количества микроорганизмов в 1 м³ воздуха.

Результаты. Пыль вентиляционных решеток контаминирована в 71,13% случаев, доля резистентных к антибиотикам штаммов бактерий — в 69,44%, бактерий, образующих биопленки, — в 48%. Биоразнообразие представлено 21 родом микроорганизмов, сохранявшимся в течение 6 мес. Во всех образцах присутствовала наноразмерная фракция. Органический субстрат представлен углеродом (16,26–50,69%), азотом (1,59–25,03%), водородом (2,03–6,67%), серой (0,15–2,38%) и кислородом (20,02–37,50%). Общее микробное число до и после открывания дверей и окон — 276 и 462 КОЕ/м³ соответственно ($p = 0,046$). Минеральный компонент содержал натрий (0,07–1,86%), магний (0,11–1,40%), алюминий (0,36–1,78%), кремний (0,21–4,64%), фосфор (0,04–0,81%), хлор (0,05–2,83%), калий (0,04–0,85%), кальций (0,19–7,49%), железо (0,08–1,61%).

Обсуждение. Широкий спектр микроорганизмов, наличие органического субстрата и микроэлементов свидетельствуют о возможности сохранения, накопления и возврата в больничную среду возбудителей ИСМП.

Заключение. На решетках вытяжных вентиляционных систем и прилежащих частей воздуховодов в условиях медицинских организаций может формироваться дополнительный резервуар микроорганизмов — возбудителей ИСМП, играющий значимую роль в поддержании эпидемического процесса ИСМП.

Ключевые слова: резервуар, микроорганизмы, пылевые частицы, инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи.

Благодарность. Результаты получены с использованием оборудования Кемеровского центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук.

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Кемеровской области в рамках научного проекта № 20-415-420004 р_а «Оценка роли пыли угольной промышленности в формировании резервуара мультирезистентных госпитальных штаммов микроорганизмов в больничной среде».

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

Для цитирования: Чезганова Е.А., Ефимова О.С., Сахарова В.М., Ефимова А.Р., Созинов С.А., Исмагилов З.Р., Брусина Е.Б. Дополнительный резервуар госпитальных микроорганизмов в медицинских организациях. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(3):266–275.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-120>

A novel source of hospital microorganisms in healthcare settings

Evgenia A. Chezganova^{1✉}, Olga S. Efimova², Vera M. Sakharova³, Anna R. Efimova⁴,
Sergey A. Sozinov², Zinfer R. Ismagilov², Elena B. Brusina¹

¹Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russia;

²Institute of Coal Chemistry and Material Science of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russia;

³Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia;

⁴Kemerovo Regional Center for Hygiene and Epidemiology, Kemerovo, Russia

Abstract

Background. Most healthcare-associated infections (HAI) develop due to a colonization of patients and healthcare workers by hospital strains of pathogens. The aim to study was to assess whether the dust within the health facilities can harbor microorganisms acting as a reservoir of HAIs.

Materials and methods. Dust samples collected in the air ducts and ventilation grilles of health facilities underwent a detailed physicochemical analysis by means of scanning electron microscopy, dynamic light scattering, energy-dispersive X-ray spectroscopy, and high-temperature catalytic oxidation. Bacterial and viral diversity was investigated using an automated biochemical analyzer and polymerase chain reaction, respectively. Investigation of the microenvironment included detection of biofilms using a catalase indicator and quantification of viable microorganisms per 1 m³ air.

Results. Dust from the hospital ventilation grilles and air ducts was contaminated with microorganisms in 71.13% of cases. Strikingly, multidrug-resistant and biofilm-forming strains have been found in 69.4% and 48.0% of samples, respectively. The total viable count before and after opening doors and windows was 276 and 462 colony-forming units/m³ respectively ($p = 0.046$). Biodiversity was represented by 21 genera of microorganisms which were consistently detected upon 6 months of follow-up. All samples contained a nanosized particulate matter. Chemical elements comprising dust were carbon (16.26–50.69%), oxygen (20.02–37.50%), nitrogen (1.59–25.03%), hydrogen (2.03–6.67%), sulfur (0.15–2.38%), calcium (0.19–7.49%), silicon (0.21–4.64%), chlorine (0.05–2.83%), sodium (0.07–1.86%), aluminum (0.36–1.78%), iron (0.08–1.61%), magnesium (0.11–1.40%), potassium (0.04–0.85%), and phosphorus (0.04–0.81%).

Discussion. A wide range of multidrug-resistant strains of bacteria, detected in a hospital particulate matter with a diverse chemical composition, indicates the persistence of HAI-causing pathogens in the hospital environment.

Conclusion. Dust from the ventilation grilles and adjacent air ducts should be considered as an additional reservoir of multidrug-resistant strains of bacteria in the healthcare settings.

Keywords: *reservoir, microorganisms, particulate matter, healthcare-associated infections*

Acknowledgement. The results were obtained using the equipment of the Kemerovo Center for Collective Use of the Federal Research Center for Coal Chemistry and Material Science of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences.

Funding source. The reported study was funded by Russian Foundation for Basic Research and Kemerovo Region «Particulate coal matter as a possible reservoir of multidrug-resistant microorganisms in a hospital environment», project number 20-415-420004 p_a.

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

For citation: Chezganova E.A., Efimova O.S., Sakharova V.M., Efimova A.R., Sozinov S.A., Ismagilov Z.R., Brusina E.B. A novel source of hospital microorganisms in healthcare settings. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(3):266–275.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-120>

Введение

Интенсивное развитие медицинских технологий неразрывно сопряжено с проблемой эффективности контроля инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП). В современной структуре подавляющее большинство (60%) ИСМП развиваются в результате колонизации локусов пациентов и медицинского персонала госпитальными штаммами (клонами) возбудителей [1]. Основным резервуаром возбудителей ИСМП яв-

ляется организм пациентов, в котором происходят селекция и накопление эпидемических вариантов возбудителей. Вместе с тем 30% всех ИСМП вызывают возбудители группы сапронозов, резервуар которых находится в больничной среде [2]. Такие микроорганизмы (МО) отличаются высокой толерантностью к неблагоприятным факторам, размножаются и накапливаются в воде, растворах, на влажных объектах [3, 4], сохраняются длительное время на оборудовании [5] и даже на сухих поверх-

ностях [6]. Роль воздушного, воздушно-пылевого путей передачи в распространении мультирезистентных МО недостаточно изучена и противоречива [7].

Цель исследования — изучение дополнительного резервуара МО в медицинских организациях.

Материалы и методы

Исследование проводилось на базах различных медицинских организаций Кемеровской области: в отделениях хирургического, реанимационного, педиатрического, инфекционного профилей. Пыль отбирали в операционных блоках, процедурных кабинетах, перевязочных, смотровых, централизованных стерилизационных отделениях; палатах интенсивной терапии реанимационных отделений, палатах отделений гнойной, общей и детской хирургии, онкологических отделений, отделений химиотерапии, пульмонологии, детских инфекционных и педиатрических отделений, госпиталя для больных COVID-19.

Отбор проб пыли ($n = 97$) осуществлялся в стерильные ёмкости стерильной перчаткой с внутренней стороны вентиляционных решёток и непосредственно прилежащих к ним частей воздухопроводов вытяжных вентиляционных систем в различных медицинских организациях.

Исследование формы, размерности и элементного состава частиц пыли ($n = 28$) проводили при помощи сканирующей электронной микроскопии на микроскопе «Jeol JSM-6390 LA» («Jeol»). Определение содержания элементов (C, H, N, S) в составе органической массы было проведено методом высокотемпературного каталитического окисления (CHNSO-анализ) с использованием элементного анализатора «Flash 2000» («ThermoScientific»). Средний размер и распределение размерности частиц пыли в растворе ($n = 28$) были определены методом динамического рассеяния света на лазерном анализаторе «ZetasizerNano ZS» («Malvern Instruments»). Перед проведением съёмки исследуемые частицы были ресуспендированы в фильтрованной (220 нм) стерильной бидистиллированной воде и обработаны ультразвуком в течение 20 мин до получения устойчивых дисперсных систем. Далее было проведено удаление крупных частиц фильтрованием через бумажный фильтр и фильтрующие насадки с диаметром пор 450 и 220 нм. Для каждого образца было выполнено 10–50 измерений, осуществлявшихся до получения не менее 5 сходящихся результатов. Температура при проведении измерения составила 25°C (с предварительным 20-минутным термостатированием).

Выявление РНК ротавирусов группы А, астровирусов и норовирусов генотипа 2 во всех пробах ($n = 97$) проводилось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флюоресцент-

ной детекцией при помощи тест-системы «АмплиСенс® Rotavirus/Norovirus/Astrovirus-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Аналогичным образом была выполнена идентификация РНК энтеровирусов ($n = 97$, тест-система «АмплиСенс® Enterovirus-FL»), РНК вируса гепатита А ($n = 97$, тест-система «АмплиСенс® HAV-FL»), РНК SARS-CoV-2 ($n = 22$, тест-система «РеалБест РНК SARS-CoV-2», «Вектор-Бест»), а также ДНК *Shigella* spp., энтероинвазивных *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. и термофильных *Campylobacter* spp. ($n = 97$, тест-системы «АмплиСенс® *Shigella* spp.» и «EIEC/*Salmonella* spp./*Campylobacter* spp.-FL»).

Для изучения бактериального состава применялась оригинальная авторская методика: пробы пыли ($n = 97$) засеивали в 1% сахарный бульон и далее инкубировали при 37°C в течение 24 ч. Затем культуры пересевали на кровяной агар, агар *Candida*, агар Orientation с последующей инкубацией при аналогичной температуре и времени. Для дифференциальной диагностики грамотрицательных МО (энтеробактерий и неферментирующих бактерий) осуществляли пересев на среду Клигелера с дальнейшим выращиванием в термостате по вышеуказанному протоколу. Определение видовой принадлежности бактерий проводили на бактериологическом автоматическом анализаторе «VITEK®2 Compact» («BioMerieux») с использованием карт «VITEK®2 GN», предназначенных для идентификации клинически значимых ферментирующих и неферментирующих грамотрицательных палочек и включающих 47 индивидуальных бактериологических тестов, а также карт «VITEK®2 GP», позволяющих идентифицировать 120 грамположительных МО. Для заполнения соответствующих карт прибора из полученных культур готовили суспензию с оптической плотностью в 0,50–0,63 стандарта МакФарланда согласно инструкции производителя («BioMerieux»). Чувствительность к антимикробным препаратам определяли на анализаторе «VITEK®2 Compact».

Индикацию биологических плёнок на поверхности 29 решеток вытяжных вентиляционных систем проводили с помощью каталазного индикатора «BFR peroxyfilm» («BFR laboratories») в соответствии с МР 4.2.0161-19 «Методы индикации биологических плёнок МО на абиотических объектах».

Определение общего количества МО в 1 м³ воздуха (КОЕ/м³) в различных функциональных подразделениях медицинской организации на расстоянии 1 м от вентиляционных решёток до и во время открывания окон и дверей проводили аспирационным методом с помощью импактора воздуха микробиологического «Флора-100» ($n = 18$). Заданный объем воздуха составил 250 дм³.

Статистическую обработку результатов осуществляли в программе «GraphPad Prism7» («Graph-

Pad Software»). Две независимые группы сравнивали по U-критерию Манна–Уитни. Различия между показателями оценивали при помощи критериев Вилкоксона, χ^2 при уровне доверительных значений $p < 0,05$.

Результаты

Выявлено, что в 69 пробах пыли присутствовали МО (71,13%). При этом в 66 пробах из 97 идентифицированы бактерии (68,04%), в 13 — вирусы (13,4%). В 11 пробах (шестая часть всех проб с МО) присутствовали и вирусы, и бактерии (11,3%). Только в 5 пробах обнаружены плесневые грибы (5,15%). Разнообразие бактерий представлено 21 родом с выраженным преобладанием в структуре грамотрицательных бактерий (76,74%) над грамположительными (23,26%), выявлено 69,44% резистентных к антибиотикам штаммов по бактериальному составу, образование биоплёнок встречалось в 48% случаев. Споровые формы бактерий в структуре составили 41,1%. Были идентифицированы *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus hominis* ssp. *hominis*, *Micrococcus* spp., *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans*, *Moraxella lacunata*, *Raoultella ornithinolytica*, *Rhizobium radiobacter*, *Klebsiella pneumoniae*, *Kluyvera intermedia*, *Pantoea*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella testudinis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas luteola*, *Aeromonas sobria*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Brevundimonas diminuta*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter lwoffii*, *Shewanella putrefaciens*, *Serratia plymuthica*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Chromobacterium violaceum*, *Cronobacter dublinensis*. Чаще других контаминировали пыль *Enterococcus* spp. (16,28%). Бактерии группы сапронозов составили в структуре 51,16%, при этом чаще встречались *Sphingomonas paucimobilis* (13,96%) и *Acinetobacter* spp. (6,98%).

РНК ротавирусов группы А обнаружена из 97 проб пыли в 13 (13,40%) образцах, в 3 (3,09%) пробах обнаружена РНК норовирусов генотипа 2. Вирусы идентифицированы в стационарах педиатрического профиля ($p = 0,0004$). Ни в одной из исследованных проб РНК SARS-CoV-2 ($n = 22$), отобранных в ковидарии, а также в медицинских организациях неинфекционного профиля, где были зарегистрированы заносы COVID-19, не была обнаружена.

При повторном исследовании (через 6 мес) микрофлоры внутренней поверхности идентичных вентиляционных решеток и прилежащих частей воздуховодов во всех случаях были обнаружены бактерии, однако не было установлено присутствия нуклеиновых кислот вирусов.

Установлено, что общее микробное число в процессе открывания и закрывания дверей и окон

составляло 20–736 КОЕ/м³, средние значения до и после открывания — 276 и 462 соответственно. Общее микробное число во время открывания дверей и окон изменялось от единичных значений до 10 раз, $p = 0,046$ (рис. 1).

Бактерии в пыли в отделениях хирургического профиля встречались в 4 раза чаще, чем в отделениях нехирургического профиля ($p = 0,0001$), в то время как значимых различий в частоте контаминации пыли вирусами не выявлено ($p = 0,361$).

Пыль в зонах медицинских технологий была контаминирована МО в 2,45 раза реже, чем пыль в зонах пребывания пациентов (палаты), $p = 0,0001$.

В исследованных образцах выявлены два морфологических типа пыли (рис. 2): с глобулярными частицами (60,71%) и микроразмерными волокнами (39,29%) без зависимости от профиля отделений, территориальной расположенности медицинских организаций. Хотя частота контаминации МО пыли с микроразмерными волокнами выше (OR = 1,78 [0,23–15,06]; $\chi^2 = 0,431$; $p = 0,512$), однако статистическая значимость показателя не достигнута.

Во всех образцах выявлена наноразмерная фракция пыли. Не установлено зависимости между размерностью частиц пыли и профилем отделений.

Подтверждено наличие органического субстрата в исследованных образцах, доли элементов составили: углерода (16,26–50,69%), азота (1,59–25,03%), водорода (2,03–6,67%), серы (0,15–2,38%) и кислорода (20,02–37,50%), при этом пыль, отобранная в отделениях реанимационного, педиатрического профиля, содержала больший весовой процент азота, чем пыль отделений хирургического

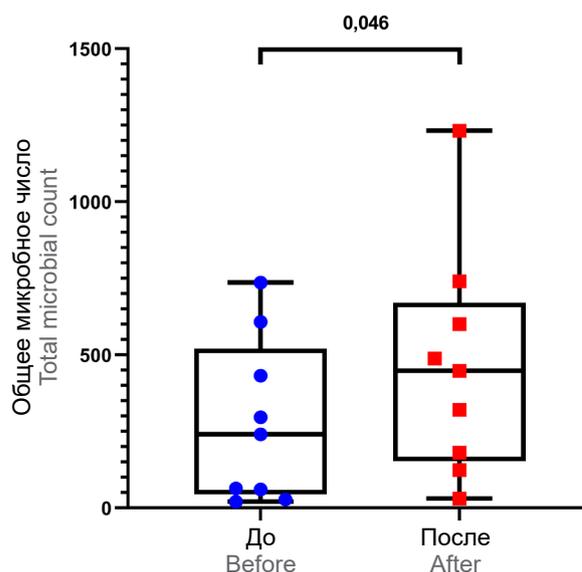


Рис. 1. Общее микробное число в помещениях многопрофильного стационара до и после открывания дверей и окон.

Fig. 1. The total microbial count in the wards of healthcare settings before and after opening doors and windows.

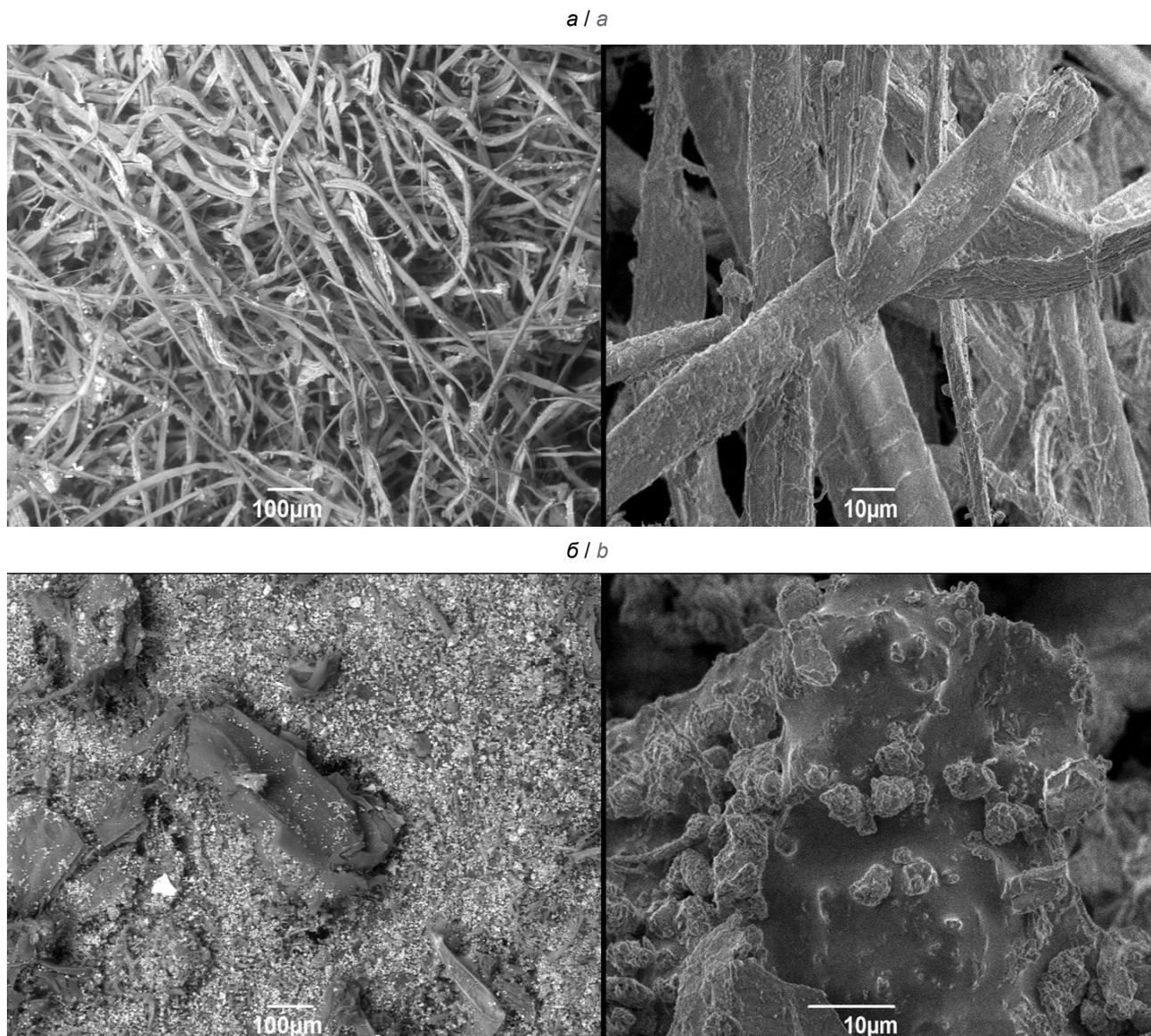


Рис. 2. Морфологическая характеристика образцов пыли микроразмерными волокнами (а) и глобулярными частицами (б).

Fig. 2. Morphological characteristics of dust samples with micro-sized fibers (a) and globular particles (b).

профиля ($p = 0,003$). Пыль, отобранная в палатах, содержала больший весовой процент азота, чем пыль, отобранная в операционных ($p = 0,05$; **рис. 3**).

При исследовании минерального компонента образцов пыли выявлены натрий (0,07–1,86%), магний (0,11–1,40%), алюминий (0,36–1,78%), кремний (0,21–4,64%), фосфор (0,04–0,81%), сера (0,19–2,58%), хлор (0,05–2,83%), калий (0,04–0,85%), кальций (0,19–7,49%), железо (0,08–1,61%). Большой весовой процент калия ($p = 0,05$) и углерода ($p = 0,02$) обнаружен в реанимационных и детских отделениях (**рис. 4**). Пыль с адсорбированными вирусами содержала больший весовой процент кислорода ($p = 0,003$) в неорганической части и азота ($p = 0,04$) в органической части, чем пыль без вирусов (**рис. 5**).

Суммарно корреляционные связи представлены на тепловой карте (**рис. 6**).

Обсуждение

Больничной стационар представляет собой специфическую экологическую систему, в которой непрерывно происходит селекция штаммов, способных эффективно конкурировать с другими МО и формировать госпитальные клоны, обладающие высоким эпидемическим потенциалом, способностью вызывать тяжелые формы инфекций и длительно сохраняться в больничной среде [1]. К настоящему времени хорошо изучены риск, условия сохранения и накопления возбудителей ИСМП на различных объектах больничной среды, оборудовании, в растворах лекарственных и дезинфици-

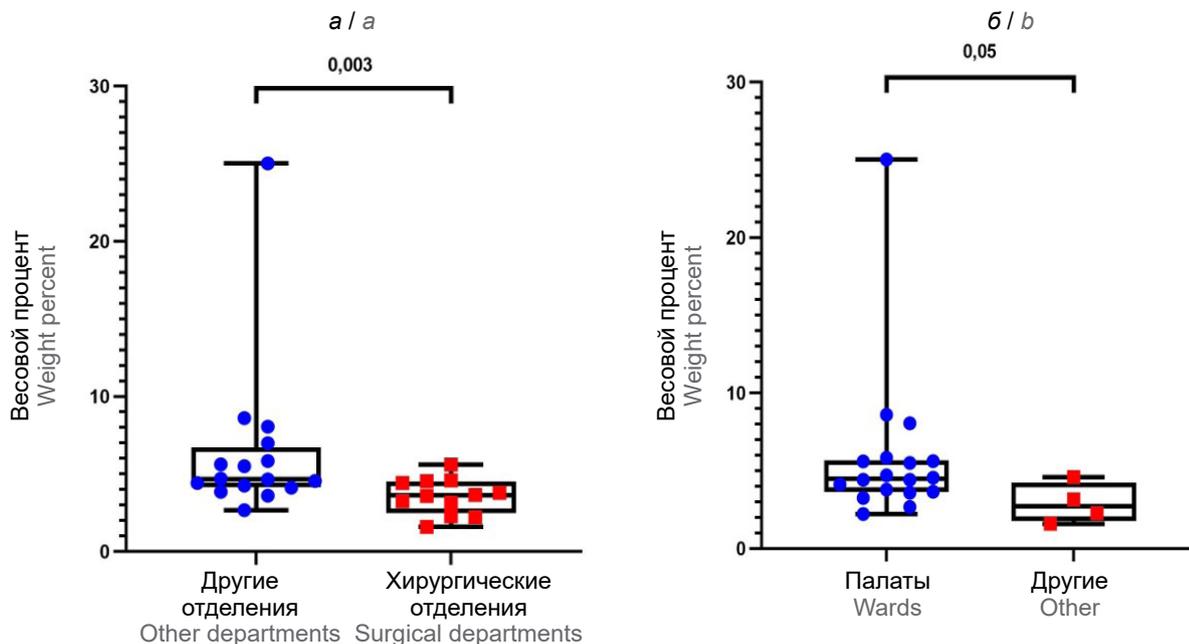


Рис. 3. Содержание азота (весовые проценты) в пыли различных типов отделений (а) и функциональных подразделений (б) медицинских организаций.

Fig. 3. The content of nitrogen (weight percent) in the dust of various types of healthcare settings (a) and functional units (b) in healthcare settings.

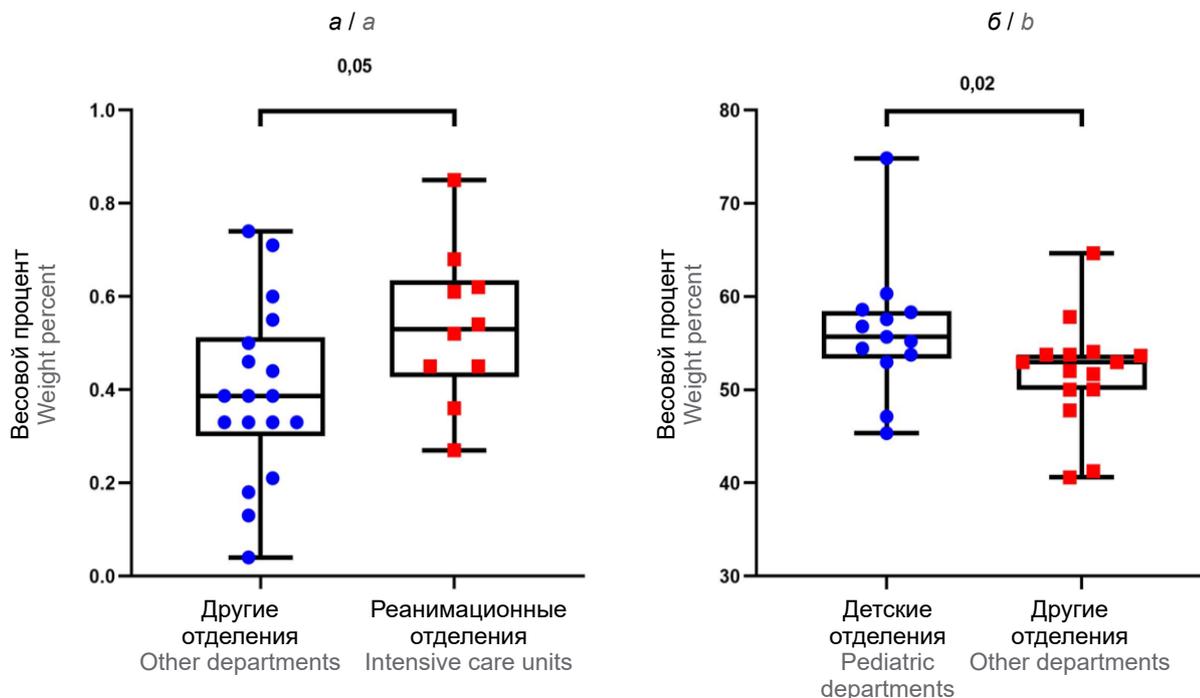


Рис. 4. Содержание калия (а) и углерода (б) в пыли различных типов отделений медицинских организаций (весовые проценты).

Fig. 4. The content of potassium (a) and carbon (b) in the dust of various types of compartments in healthcare settings (weight percent).

рующих средств. Показана зависимость сохранения жизнеспособных МО от температуры, влажности [8], рН среды, присутствия других МО, химических веществ, материала поверхностей (металл, пластик,

резина и др. [9]. Подробно изучены различные факторы передачи, такие как вода, руки, инструменты [10], растворы, конструктивные элементы аппаратов [11, 12].

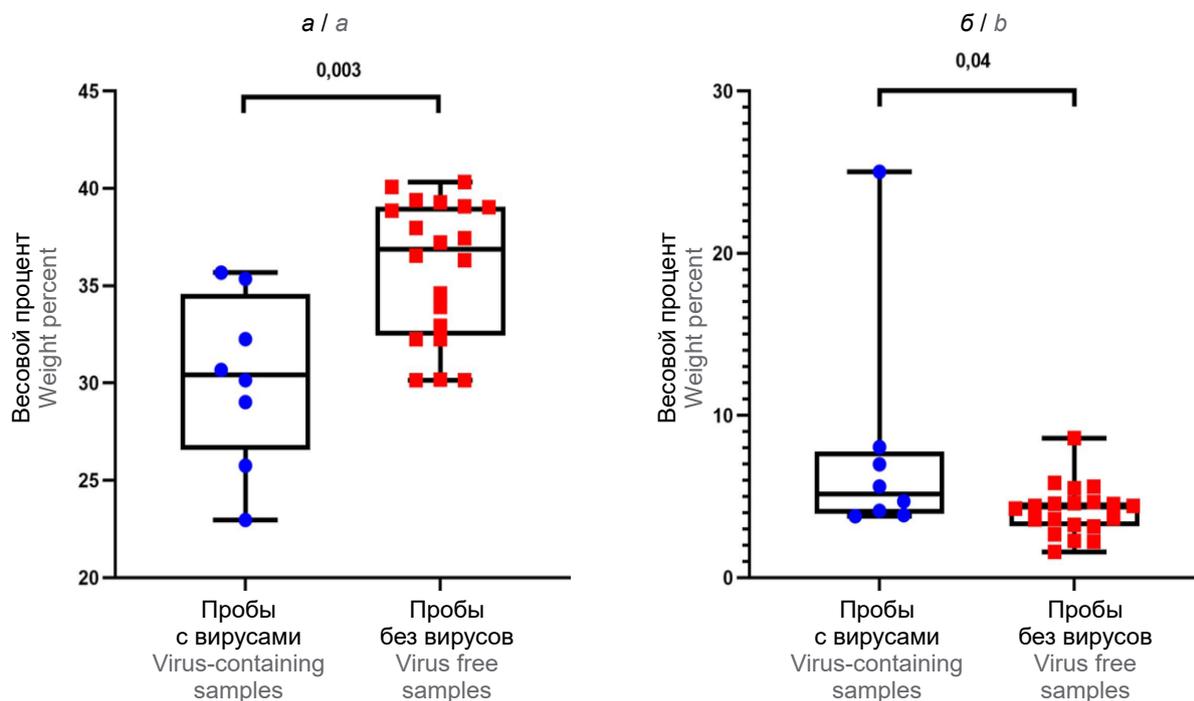


Рис. 5. Содержание кислорода (а) и азота (б) в пыли с адсорбированными вирусами и без них (весовые проценты).

Fig. 5. The content of oxygen (a) and nitrogen (b) in the dust with and without adsorbed viruses (weight percent).

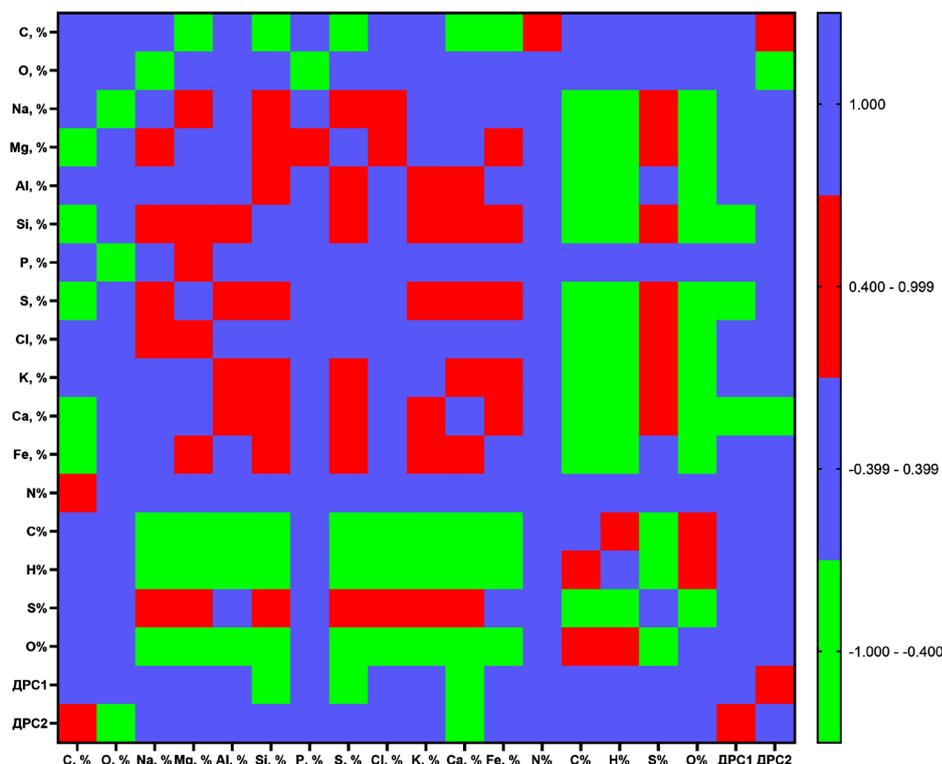


Рис. 6. Тепловая карта. Цветом обозначены коэффициенты корреляции.

Fig. 6. Heatmap. The color indicates the correlation coefficients.

Априори считается, что присутствие пыли в медицинских организациях минимально, а следовательно, несущественна и её роль в передаче возбудителей ИСМП. Однако в последние годы аэро-

зольной передаче возбудителей ИСМП уделяется всё больше внимания. Работами исследовательской группы L. Bourgoiба и соавт. был убедительно показан турбулентный характер распространения по-

тока аэрозоля, образующего при физиологических и патологических респираторных актах, и направленное его движение не только в сагиттальной плоскости, но и в верхние слои воздушного пространства помещения, вентиляционные каналы, а также неопределенно долгая циркуляция наноразмерных частиц и возможность перемещения этой фракции аэрозольного облака на значительные расстояния [13]. Вентиляционные каналы, как известно, подлежат периодической дезинфекции. Однако внутренние поверхности вентиляционных решеток и прилежащее к ним пространство воздуховода часто содержит пыль, т.к. недоступно для регулярной очистки, удаления пыли и дезинфекции. Это приводит к созданию резервуара для МО, которые с воздушными потоками в комплексе пылевая частица–МО способны возвращаться в зону дыхания и проникать в носоглотку и дыхательные пути пациентов. Обнаруженный широкий спектр МО, в том числе мультирезистентных к антибиотикам штаммов бактерий, РНК рота- и норовирусов и высокая частота контаминации пыли вентиляционных решеток свидетельствуют о возможности не только сохранения, но и накопления, возврата в больничную среду актуальных возбудителей ИСМП. Эксперимент с открыванием окон и дверей подтвердил значительное возрастание микробной обсемененности воздуха палат на расстоянии 1 м под вентиляционной решеткой, что подтверждает возможность контаминации не только зоны дыхания пациента, но и поверхностей больничной среды, риска колонизации локусов организма пациента. Такой возврат в больничную среду ротавирусов может приводить к групповой внутрибольничной заболеваемости ротавирусной инфекцией, поскольку инфицирующая доза для развития заболевания мала. Обнаружение наноразмерной фракции (< 5 мкм) во всех исследованных образцах пыли подтвердило риск длительной циркуляции комплекса частица–МО в воздушной среде, проникновения в нижние отделы дыхательных путей, что как минимум существенно для колонизации этого локуса. Полученные нами данные согласуются с результатами других исследователей [14].

Очевидно неблагоприятные условия сухой пыли определили избирательность сохранения МО: значительная доля выделенных в пыли бактерий были грамотрицательные (76,74%), проявляли резистентность к антибиотикам (69,44%), почти половина относилась к группе сапронозов, находилась в споровой форме, образовывали биопленки, что увеличивает значение пыли в сохранении наиболее способных к широкому распространению штаммов МО. Однако выживание бактерий на объектах больничной среды не является достаточным критерием существования в больничной пыли дополнительного резервуара. Вместе с тем длительность

существования возбудителей ИСМП в пыли (6 мес), установленное наличие органического субстрата (углерода, водорода, азота, серы и кислорода), присутствующее разнообразие микроэлементов (натрий, магний, алюминий, кремний, фосфор, калий, кальций, железо) позволяют потенциально рассматривать пыль, скапливающуюся на внутренних поверхностях вентиляционных решеток, прилежащих к ним частей воздухопроводов вытяжных систем как дополнительный резервуар резистентных госпитальных штаммов МО. Ранее нами была показана триггерная роль присутствующих в пыли угольных микрочастиц в сохранении возбудителей ИСМП [15]. Что касается связи морфологии пылевых частиц с частотой и характером контаминации МО, то она требует дополнительного уточнения. В настоящее время можно утверждать, что значение этого дополнительного резервуара отличается для разных структурных отделений и функциональных подразделений стационара, видов МО.

Заключение

На решетках вытяжных вентиляционных систем и прилежащих частях воздухопроводов в условиях медицинских организаций может формироваться дополнительный резервуар МО — возбудителей ИСМП, играющий значимую роль в поддержании эпидемического процесса ИСМП.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Брико Н.И., Брусина Е.Б., Зуева Л.П., Ковалишена О.В., Ряпис Л.А., Стасенко В.Л. и др. Госпитальный штамм – неизвестная реальность. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2013; (1): 30–5.
2. Брусина Е.Б. Эпидемиология инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, вызванных возбудителями группы сапронозов. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2015; 14(2): 50–6.
<https://doi.org/10.31631/2073-3046-2015-14-2-50-56>
3. Salm F., Deja M., Gastmeier P., Kola A., Hansen S., Behnke M., et al. Prolonged outbreak of clonal MDR *Pseudomonas aeruginosa* on an intensive care unit: contaminated sinks and contamination of ultra-filtrate bags as possible route of transmission? *Antimicrob. Resist. Infect. Control*. 2016; 5: 53.
<https://doi.org/10.1186/s13756-016-0157-9>
4. Kanwar A., Domitrovic T.N., Koganti S., Fuldauer P., Cadnum J.L., Bonomo R.A., et al. A cold hard menace: A contaminated ice machine as a potential source for transmission of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Am. J. Infect. Control*. 2017; 45(11): 1273–5.
<https://doi.org/10.1016/j.ajic.2017.05.007>
5. Johnson R.C., Deming C., Conlan S., Zellmer C.J., Michelin A.V., Lee-Lin S., et al. Investigation of a cluster of *Sphingomonas koreensis* infections. *N. Engl. J. Med.* 2018; 379(26): 2529–39. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1803238>
6. Robustillo-Rodela A., Pérez-Blanco V., Espinel Ruiz M.A., Ruiz Carrascoso G., Figueira Iglesias J.C., Abad Martín D. Successful control of 2 simultaneous outbreaks of OXA-48 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit. *Am. J. Infect. Control*. 2017; 45(12): 1356–62.
<https://doi.org/10.1016/j.ajic.2017.07.018>

7. Chia P., Sengupta S., Kukreja A., Ponnampalavanar S., Ng O.T., Marimuthu K. The role of hospital environment in transmissions of multidrug-resistant gram-negative organisms. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* 2020; 9(1): 29. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-0685-1>
8. Dekic S., Hrenovic J., van Wilpe E., Venter C., Goic-Barisic I. Survival of emerging pathogen *Acinetobacter baumannii* in water environment exposed to different oxygen conditions. *Water Sci. Technol.* 2019; 80(8): 1581–90. <https://doi.org/10.2166/wst.2019.408>
9. Parvin F., Hu H., Whiteley G.S., Glasbey T., Vickery K. Difficulty in removing biofilm from dry surfaces. *J. Hosp. Infect.* 2019; 103(4): 465–7. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2019.07.005>
10. Chen J.C., Munir M.T., Aviat F., Lepelletier D., Le Pape P., Dubreil L., et al. Survival of bacterial strains on wood (*Quercus petraea*) compared to polycarbonate, aluminum and stainless steel. *Antibiotics (Basel)*. 2020; 9(11): 804. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110804>
11. Weber D.J., Anderson D., Rutala W.A. The role of the surface environment in healthcare-associated infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2013; 26(4): 338–44. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3283630f04>
12. Harris D., Taylor K.P., Napierkowski K., Zechmann B. Indoor finish material influence on contamination, transmission, and eradication of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *HERD*. 2020; 14(1): 118–28. <https://doi.org/10.1177/1937586720952892>
13. Bourouiba L., Dehandschoewercker E., Bush J. Violent expiratory events: on coughing and sneezing. *J. Fluid Mech.* 2014; 745: 537–63. <https://doi.org/10.1017/jfm.2014.88>
14. Liu N.M., Miyashita L., Maher B.A., McPhail G., Jones C.J.P., Barratt B., et al. Evidence for the presence of air pollution nanoparticles in placental tissue cells. *Sci. Total Environ.* 2021; 751: 142235. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142235>
15. Чезганова Е.А., Ефимова А.Р., Сахарова В.М., Ефимова А.Р., Созинов С.А., Исмагилов З.Р. и др. Оценка роли пыли в формировании резервуара мультирезистентных госпитальных штаммов микроорганизмов в отделениях хирургического профиля. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2020; 5(1): 15–25. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2019-4-3-8-14>
4. Kanwar A., Domitrovic T.N., Koganti S., Fuldauer P., Cadnum J.L., Bonomo R.A., et al. A cold hard menace: A contaminated ice machine as a potential source for transmission of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Am. J. Infect. Control.* 2017; 45(11): 1273–5. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2017.05.007>
5. Johnson R.C., Deming C., Conlan S., Zellmer C.J., Michelin A.V., Lee-Lin S., et al. Investigation of a cluster of *Sphingomonas koreensis* infections. *N. Engl. J. Med.* 2018; 379(26): 2529–39. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1803238>
6. Robustillo-Rodela A., Pérez-Blanco V., Espinel Ruiz M.A., Ruiz Carrascoso G., Figueira Iglesias J.C., Abad Martín D. Successful control of 2 simultaneous outbreaks of OXA-48 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit. *Am. J. Infect. Control.* 2017; 45(12): 1356–62. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2017.07.018>
7. Chia P., Sengupta S., Kukreja A., Ponnampalavanar S., Ng O.T., Marimuthu K. The role of hospital environment in transmissions of multidrug-resistant gram-negative organisms. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* 2020; 9(1): 29. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-0685-1>
8. Dekic S., Hrenovic J., van Wilpe E., Venter C., Goic-Barisic I. Survival of emerging pathogen *Acinetobacter baumannii* in water environment exposed to different oxygen conditions. *Water Sci. Technol.* 2019; 80(8): 1581–90. <https://doi.org/10.2166/wst.2019.408>
9. Parvin F., Hu H., Whiteley G.S., Glasbey T., Vickery K. Difficulty in removing biofilm from dry surfaces. *J. Hosp. Infect.* 2019; 103(4): 465–7. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2019.07.005>
10. Chen J.C., Munir M.T., Aviat F., Lepelletier D., Le Pape P., Dubreil L., et al. Survival of bacterial strains on wood (*Quercus petraea*) compared to polycarbonate, aluminum and stainless steel. *Antibiotics (Basel)*. 2020; 9(11): 804. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110804>
11. Weber D.J., Anderson D., Rutala W.A. The role of the surface environment in healthcare-associated infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2013; 26(4): 338–44. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3283630f04>
12. Harris D., Taylor K.P., Napierkowski K., Zechmann B. Indoor finish material influence on contamination, transmission, and eradication of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *HERD*. 2020; 14(1): 118–28. <https://doi.org/10.1177/1937586720952892>
13. Bourouiba L., Dehandschoewercker E., Bush J. Violent expiratory events: on coughing and sneezing. *J. Fluid Mech.* 2014; 745: 537–63. <https://doi.org/10.1017/jfm.2014.88>
14. Liu N.M., Miyashita L., Maher B.A., McPhail G., Jones C.J.P., Barratt B., et al. Evidence for the presence of air pollution nanoparticles in placental tissue cells. *Sci. Total Environ.* 2021; 751: 142235. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142235>
15. Чезганова Е.А., Ефимова А.Р., Сахарова В.М., Ефимова А.Р., Созинов С.А., Исмагилов З.Р., et al. Particulate matter as a possible reservoir of multidrug-resistant microorganisms in surgical healthcare settings. *Fundamental'naya i klinicheskaya meditsina*. 2020; 5(1): 15–25. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2019-4-3-8-14> (in Russian)

REFERENCES

1. Briko N.I., Brusina E.B., Zueva L.P., Kovalishena O.V., Ryapis L.A., Stasenko V.L., et al. Hospital strain — mysterious reality. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika*. 2013; (1): 30–5. (in Russian)
2. Brusina E.B. Epidemiology of healthcare-associated infections, caused by sapronoses group pathogens. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika*. 2015; 14(2): 50–6. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2015-14-2-50-56> (in Russian)
3. Salm F., Deja M., Gastmeier P., Kola A., Hansen S., Behnke M., et al. Prolonged outbreak of clonal MDR *Pseudomonas aeruginosa* on an intensive care unit: contaminated sinks and contamination of ultra-filtrate bags as possible route of transmission? *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* 2016; 5: 53. <https://doi.org/10.1186/s13756-016-0157-9>

Информация об авторах

Чезганова Евгения Андреевна[✉] — аспирант каф. эпидемиологии КГМУ, Кемерово, Россия, echezganova1994@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0770-0993>

Ефимова Ольга Сергеевна — к.х.н., н.с. лаб. высокотемпературных углеродных материалов Института углехимии и химического материаловедения СО РАН, Кемерово, Россия, <https://orcid.org/0000-003-4495-0983>

Information about the authors

Evgenia A. Chezganova[✉] — postgraduate student, Department of epidemiology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russia, echezganova1994@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0770-0993>

Olga S. Efimova — Cand. Sci. (Chem.), researcher, Institute of Coal Chemistry and Material Science, Kemerovo, Russia, <https://orcid.org/0000-003-4495-0983>

Сахарова Вера Михайловна — врач-бактериолог НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7458-0621>

Ефимова Анна Роняевна — к.м.н., врач-вирусолог Центра гигиены и эпидемиологии в Кемеровской области, Кемерово, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9319-3053>

Созинов Сергей Анатольевич — к.физ.-мат.н., в.н.с. Института углекислоты и химического материаловедения СО РАН, Кемерово, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2833-1536>

Исмагилов Зинфер Ришатович — д.х.н., проф., член-корр. РАН, директор Института углекислоты и химического материаловедения СО РАН, Кемерово, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1520-9216>

Брусина Елена Борисовна — д.м.н., проф., зав. каф. эпидемиологии КГМУ, Кемерово, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8616-3227>

Участие авторов. ЧЕА — сбор материала, анализ полученных данных, написание статьи; ЕОС — исследование распределения частиц по размерам методом динамического рассеяния света, элементный анализ пылевых частиц; СВМ — микробиологическое исследование образцов пыли; ЕАР — микробиологическое исследование образцов пыли; ССА — проведение сканирующей электронной микроскопии; ИЗР — разработка концепции и дизайна исследования, координация проведения исследований по изучению физико-химических свойств пылевых частиц, анализ результатов; БЕБ — разработка концепции и дизайна исследования, координация выполнения работы, анализ результатов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 27.01.2021;
принята к публикации 22.03.2021;
опубликована 27.05.2021

Vera M. Sakharova — bacteriologist, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7458-0621>

Anna R. Efimova — Cand. Sci. (Med.), virologist, Kemerovo Regional Center of Hygiene and Epidemiology, Kemerovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9319-3053>

Sergey A. Sozinov — Cand. Sci. (Phys.-Math.), leading researcher, Institute of Coal Chemistry and Material Science, Kemerovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2833-1536>

Zinfer R. Ismagilov — D. Sci. (Chem.), Prof., Academician of RAS, chief executive officer, Institute of Coal Chemistry and Material Science, Kemerovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1520-9216>

Elena B. Brusina — D. Sci. (Med.), Prof., Head, Department of epidemiology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8616-3227>

Author contribution. EAC — data collection, data analysis, manuscript writing; OSE — dynamic light scattering, elemental composition of the particulate matter; VMS — microbiological analysis of the particulate matter; ARE — microbiological analysis of the particulate matter; SAS — scanning electron microscopy; ZRI — study design and coordination; data analysis; EBB — study design and coordination; data analysis. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 27.01.2021;
accepted for publication 22.03.2021;
published 27.05.2021

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-86>

Механизм персистенции индигенных бифидобактерий под действием ацетата в кишечном биотопе человека

Бухарин О.В., Андрищенко С.В.✉, Перунова Н.Б., Иванова Е.В.

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Оренбургского федерального исследовательского центра Уральского отделения РАН, Оренбург, Россия

Аннотация

Цель исследования — определить роль ацетата в персистенции индигенных бифидобактерий в кишечном биотопе через лизоцимрезистентность в модельных условиях ацетилирования–деацетилирования пептидогликана.

Материалы и методы. Исследовано по 16 штаммов двух видов индигенных бифидобактерий: *Bifidobacterium bifidum* и *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*. Бифидобактерии культивировали в CO₂-инкубаторе при содержании O₂ 0,6%, CO₂ 9% и температуре 37°C в течение 48 ч. Продукцию уксусной кислоты (ацетата) бифидобактериями выявляли методом газовой хроматографии. Влияние ацетата на устойчивость неиндигенных грамположительных бактерий к лизоциму определяли на модели штамма *Listeria monocytogenes* ICIS-280 путём культивирования в бульоне LB-Lennox с добавлением ацетата аммония в диапазоне концентраций, продуцируемых исследуемыми бифидобактериями, в серии разведений лизоцима в конечных концентрациях от 5 до 40 мкг/мл в течение 24 ч.

Результаты. Установлено, что у *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* выделение ацетата в среднем было в 2 раза выше, чем у *Bifidobacterium bifidum* (14,7 и 27 ммоль/л соответственно), и вполне соответствовало концентрациям уксусной кислоты, определённым в кишечном содержимом (до 50 ммоль/л). Культивирование бифидобактерий в среде с лизоцимом, ацетатом аммония и их сочетанием не оказало существенного влияния на их показатели роста при максимальных использованных концентрациях данных веществ. У тест-штамма добавление ацетата аммония в диапазоне, создаваемом бифидобактериями, вызывало снижение минимальной подавляющей концентрации лизоцима более чем в 2 раза — от 40 до менее 20 мкг/мл. В контрольной среде без лизоцима не отмечено ингибирования роста индикаторной культуры вплоть до максимальных концентраций ацетата аммония.

Заключение. Выявлен механизм персистенции (выживания) индигенных бифидобактерий в кишечном биотопе человека путём продукции ацетата, избирательно подавляющего лизоцимрезистентность неиндигенных грамположительных бактерий, за счёт обратимости деацетилирования пептидогликана, что позволяет индигенным бифидобактериям сохранять стабильное доминантное положение в биотопе.

Ключевые слова: бифидобактерии, персистенция, пептидогликан, лизоцимрезистентность, ацетат, кишечная микробиота, микробиоценоз

Этическое утверждение. Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен локальным комитетом по биоэтике ИКВС УрО РАН (протокол № 1 от 21.04.2020).

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

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

Для цитирования: Бухарин О.В., Андрищенко С.В., Перунова Н.Б., Иванова Е.В. Механизм персистенции индигенных бифидобактерий под действием ацетата в кишечном биотопе человека. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(3):276–282.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-86>

Mechanism of persistence of indigenous bifidobacteria under the impact of acetate in the human colon biotope

Oleg V. Bukharin, Sergey V. Andryuschenko[✉], Natalia B. Perunova, Elena V. Ivanova

Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Orenburg of Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Russia

Abstract

Aim. To determine the role of the acetate in the persistence of indigenous bifidobacteria in the colon biotope through the lysozyme resistance in model conditions of the acetylation–deacetylation of peptidoglycan.

Materials and methods. The study was performed on 16 strains of the two indigenous bifidobacteria species: *Bifidobacterium bifidum* и *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*. Bifidobacteria was cultivated in the 0.6% O₂ and 9% CO₂ atmosphere at the temperature 37°C in CO₂ incubator for 48 hours. The production of the acetate by the bifidobacteria was determined by gas chromatography. The effect of the acetate on the lysozyme resistance of non-indigenous gram-positive bacteria was determined on the *Listeria monocytogenes* ICIS-280 model strain by the cultivation in LB-Lennox broth with ammonium acetate added in the concentration range matching the concentrations produced by the studied bifidobacteria, in lysozyme serial dilutions at final concentrations 5 µg/ml to 40 µg/ml within 24 hours.

Results. It was found that the acetate release of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* was on average two times higher that of *Bifidobacterium bifidum* (27.0 and 14.7 mmol/liter, respectively) and was quite consistent with the concentrations of acetic acid determined in the intestinal contents (up to 50 mmol/liter). Cultivation of bifidobacteria in a medium with lysozyme, ammonium acetate and their combination did not have a significant impact on their growth parameters at the maximum used concentrations of these substances. In the test strain, the addition of ammonium acetate in the range created by bifidobacteria caused a decrease in the minimum inhibitory concentration of lysozyme by more than two times — from 40 µg/ml to less than 20 µg/ml. In the control medium without lysozyme, no inhibition of the growth of the indicator culture was observed up to the maximum concentrations of ammonium acetate.

Conclusion. The mechanism of persistence (survival) of indigenous bifidobacteria in the human intestinal biotope has been identified, which is associated with the production of acetic acid at a level that selectively suppresses lysozyme resistance of non-indigenous gram-positive microbiota via reversible deacetylation of peptidoglycan. This allows indigenous bifidobacteria to maintain a stable dominant position in the biotope.

Keywords: *bifidobacteria*, *bacterial persistence*, *peptidoglycan*, *lysozyme resistance*, *acetate*, *intestinal microbiota*, *microbiocenosis*

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Local Bioethics Committee of the Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis (Approval No. 1, 21.04.2020).

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

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

For citation: Bukharin O.V., Andryuschenko S.V., Perunova N.B., Ivanova E.V. Mechanism of persistence of indigenous bifidobacteria under the impact of acetate in the human colon biotope. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(3):276–282.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-86>

Введение

Среди биотопов организма человека толстый кишечник отличается исключительно высокой численностью и разнообразием микроорганизмов. Данные об их экологической структуре, механизмах и условиях формирования всё ещё характеризуются существенной неполнотой и противоречивостью. В данном биотопе обращают на себя внимание бактерии рода *Bifidobacterium*, которые важны для нормального функционирования пищеварительного тракта человека [1] и дискриминации в организме патогенов [2].

Главным конечным метаболитом индигенных бифидобактерий является уксусная кислота [3]. Ранее было показано, что именно её продукция предотвращает летальную инфекцию энтеропатогенных *Escherichia coli* [4]. Однако механизм протективного эффекта метаболитов бифидобактерий в отношении патогенной или условно-патогенной грамположительной микробиоты не изучен.

Известно, что в основе формирования симбиотических взаимодействий бактерий с хозяином лежит явление персистенции (длительного выживания микроорганизмов в организме хозяина), где ключе-

вой биомембране иммунитета является клеточная стенка — её пептидогликан (ПГ) [5], а разрушает ПГ фермент лизоцим. В случае грамположительных бактерий ПГ открыт для иммунной системы хозяина (не защищен). Единственный описанный к настоящему времени механизм обеспечения устойчивости грамположительных бактерий к ферментативному действию лизоцима — модификация ПГ [6].

Известны два наиболее распространённых пути такой модификации:

1) O-ацетилирование ПГ, встречающееся как у грамположительных, так и у некоторых грамотрицательных бактерий [7], обеспечивающее толерантность к лизоциму ПГ *Bifidobacterium longum* [8];

2) де-N-ацетилирование ПГ, выявляемое только у грамположительных бактерий.

Наше внимание обратил на себя тот факт, что де-N-ацетилазы ПГ выявлялись преимущественно у микроорганизмов, которые нельзя было отнести к резидентной микробиоте человека, в частности бацилл, клостридий [9] и листерий. Однако именно этот механизм обеспечивал основной вклад в их лизоцимрезистентность [10].

Оба механизма включали уксусную кислоту, но в разнонаправленном качестве. В случае O-ацетилирования её остаток (ацетат) присоединяется к остатку N-ацетилмурамовой кислоты ПГ, а в случае де-N-ацетилирования — отщепляется от остатка N-ацетилглюкозамина ПГ. При этом фермент де-N-ацетилаза ПГ, относящийся к 4-му семейству эстераз углеводов, подобно деацетилазе хитина, также является обратимым [11]. Поэтому избыточный ацетат в среде способен смещать равновесие реакции деацетилирования в сторону интактного ПГ. Другими словами, свободный ацетат может блокировать устойчивость к лизоциму чужеродных для кишечника человека грамположительных бактерий.

Цель исследования — определить роль ацетата в персистенции индигенных бифидобактерий в кишечном биоценозе через лизоцимрезистентность в модельных условиях ацетилирования–деацетилирования ПГ.

Материалы и методы

Объекты исследования

На первом этапе работы были отобраны 16 штаммов двух наиболее распространённых видов индигенных бифидобактерий: *Bifidobacterium bifidum* и *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, выделенных ранее после получения информированного согласия от условно здоровых лиц (по 1 штамму от каждого обследуемого) в лаборатории инфекционной симбиологии ИКВС УрО РАН в рамках исследования «Диагностический цитокиновый маркер бесплодия мужчин — интерлейкин 4» (протокол заседания локального комитета по биоэтике ИКВС УрО РАН от 21.04.2021 № 1). Штаммы

идентифицировали по культурально-морфологическим признакам, биохимическим свойствам с использованием набора «ANAEROtest-23» («LaChema») и по белковому профилю методом MALDI-TOF на масс-спектрометре «Microflex» («Bruker Daltonics»).

Определение ацетат-продукции бифидобактериями

С целью установления диапазона концентраций ацетата, создаваемого индигенными бифидобактериями кишечника, определяли уровень его продукции *in vitro* методом газовой хроматографии. Бифидобактерии вносили в количестве 10^8 КОЕ в объёме 0,1 мл бактериальной взвеси в 0,9% растворе NaCl в 4,9 мл бульона Shaedler («HiMedia») и культивировали в CO₂-инкубаторе («Binder») при содержании O₂ 0,6%, CO₂ 9% и температуре 37°C в течение 48 ч. Пробы центрифугировали при 13 600g в течение 15 мин, к 500 мкл супернатанта добавляли 50 мкл 98% серной кислоты («Panreac»). Экстракцию летучих жирных кислот из образцов осуществляли в 750 мкл изобутилового спирта («Sigma-Aldrich»), процесс повторяли дважды. Детекцию ацетата проводили в газожидкостном хроматографе «GC-2010 Plus» («Shimadzu»), оборудованном пламенно-ионизационным детектором с капиллярной колонкой HP-FFAP («Agilent Technologies») диаметром 0,32 мм, длиной 50 м. Температура испарителя составила 240°C; температурная программа для капиллярной колонки: 0 мин — 70°C, 10 мин — 160°C, 5 мин — 180°C и 25 мин — 240°C; температура детектора — 260°C. В качестве газа-носителя использован гелий, скорость газа-носителя — 21 см/с. Расчёт концентраций по площадям пиков осуществляли с помощью программного обеспечения «GCsolution» («Shimadzu»).

Определение влияния ацетата на уровень лизоцимрезистентности бактерий

Устойчивость бактерий к лизоциму определяли путём культивирования в бульоне LB-Lennox с добавлением серии разведений лизоцима куриного яичного белка («Sigma») в конечных концентрациях 5–40 мкг/мл в 3 повторах.

Среди грамположительных неиндигенных бактерий в качестве индикатора нами была выбрана тест-культура *Listeria monocytogenes* (штамм ICIS-280), поскольку для данного вида наиболее полно описана роль де-N-ацетилазы ПГ в обеспечении устойчивости к C-лизоциму [10]. Модельные условия инкубации тест-штамма: в бульоне LB-Lennox при 37°C в течение 24 ч в серии разведений лизоцима, идентичных указанным для бифидобактерий.

Для определения влияния ацетата на устойчивость исследуемых бактерий к лизоциму использовали нейтральную соль уксусной кислоты — ацетата аммония, добавленную в среду культивирова-

Характеристика продукции ацетата исследуемыми штаммами бифидобактерий ($M \pm m$)

Characteristics of the acetate production of the studied bifidobacteria strains ($M \pm m$)

<i>B. bifidum</i>		<i>B. longum</i>	
штаммы strains	ацетат, мМ acetate, mM	штаммы strains	ацетат, мМ acetate, mM
ICIS-216	6,4 ± 1,4	ICIS-281	11,2 ± 1,7
ICIS-503	7 ± 2,3	ICIS-744	12 ± 1,8
ICIS-629	7,3 ± 1,7	ICIS-1112	14,3 ± 1,8
ICIS-040	7,4 ± 1,8	ICIS-347	18 ± 1,6
ICIS-745	8,4 ± 1,2	ICIS-953	20 ± 1,55
ICIS-600	9,2 ± 2,3	ICIS-609	20,5 ± 2
ICIS-059	9,4 ± 1,6	ICIS-1113	22 ± 2,25
ICIS-752	10 ± 2,8	ICIS-749	23 ± 2,2
ICIS-460	11 ± 2,3	ICIS-505	28,3 ± 2,8
ICIS-105	13 ± 2,6	ICIS-950	28,6 ± 4,3
ICIS-949	13 ± 2,4	ICIS-984	29,1 ± 2,7
ICIS-349	15 ± 2,5	ICIS-1122	35 ± 3,5
ICIS-1074	21 ± 3,5	ICIS-889	38 ± 2,9
ICIS-750	22,4 ± 1,7	ICIS-049	39,1 ± 3,4
ICIS-691	36,4 ± 2,7	ICIS-210	42,5 ± 3
ICIS-310	38,5 ± 1,7	ICIS-627	50,6 ± 3,1
Среднее Average	14,7 ± 2,5	Среднее Average	27 ± 2,9

Примечание. Выделены штаммы, подвергнутые полногеномному секвенированию.

Note. The strains with available complete genome sequences are emphasized.

ния в диапазоне молярных концентраций ацетата, создаваемых исследованными штаммами бифидобактерий. Наличие роста тест-штамма определяли фотометрически на микропланшетном фотометре «Multiscan Ascent» при длине волны 450 нм и превышении оптической плотности (ОП) культуральной среды над таковой у контрольного стерильного бульона более чем на 0,01. Статистический анализ проводили с использованием критерия *U* Манна-Уитни [12] в программе «Minitab 14.1».

Результаты

Характеристика ацетат-продукции индигенных бифидобактерий

У бактерий вида *B. bifidum* выделение уксусной кислоты варьировало в диапазоне 6,4–38,5 ммоль/л, тогда как у штаммов, принадлежащих к *B. longum* subsp. *longum*, выделение ацетата в среднем было в 2 раза выше ($p < 0,01$), варьировало в пределах 11,2–50,6 ммоль/л (таблица) и вполне соответствовало концентрациям уксусной кислоты, определённым в кишечном содержимом [13].

В то же время максимальные уровни продукции ацетата у *B. bifidum* оказались на 10 ммоль/л вы-

ше среднего уровня, определённого для *B. longum* subsp. *longum*, но гомологов любого из 7 генов 2 систем активного транспорта фруктозы, маннозы и рибозы, описанных как ключевые детерминанты высокого уровня продукции ацетата бифидобактериями [4], не было выявлено ни в секвенированном ранее геноме штамма с рекордным уровнем ацетат-продукции (*B. bifidum* ICIS-310; NCBI BioProject accession: PRJNA345151), ни в одном из других секвенированных штаммов *B. bifidum*, депонированных в базах данных NCBI [14]. При этом в геноме штамма со средним уровнем продукции ацетата 28,3 ммоль/л (*B. longum* subsp. *longum* ICIS-505; NCBI BioProject accession: PRJNA379379) все данные детерминанты присутствовали в том же виде, что и в геномах типовых штаммов *B. longum* MC-42 и *B. longum* NCC2705. Данные факты показывают, что высокая интенсивность продукции уксусной кислоты бифидобактериями может быть обеспечена не только при наличии указанных в работе [4] генетических детерминант мембранного транспорта углеводов.

Влияние ацетата на лизоцимрезистентность индикаторного штамма

Для оценки влияния ацетата на лизоцимрезистентность бактерий, деацетилирующих свой ПГ, проведено определение минимальной подавляющей концентрации лизоцима у тест-штамма *Listeria monocytogenes* в средах с добавлением ацетата аммония и лизоцима в 3 повторах. В качестве критерия роста культуры использовали повышение ОП контрольного штамма. В средах с комбинированным добавлением лизоцима и ацетата аммония в диапазоне, создаваемом индигенными бифидобактериями, отмечено снижение МПК лизоцима для штамма-индикатора более чем в 2 раза — от 40 до менее чем 20 мкг/мл (рис. 1). Устойчивость листе-

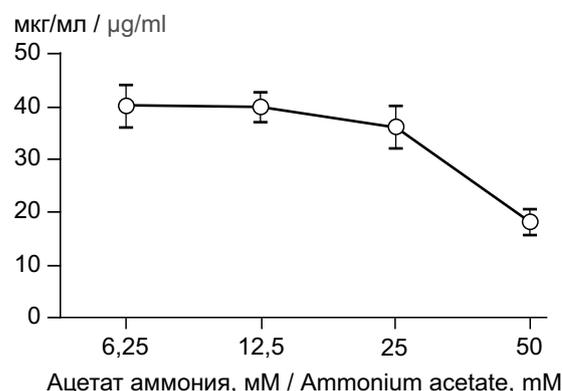


Рис. 1. Влияние ацетата аммония на минимальную подавляющую концентрацию лизоцима индикаторного штамма *Listeria monocytogenes* ICIS-280.

Fig. 1. Effect of the ammonium acetate on lysozyme minimum inhibitory concentration of the model strain *Listeria monocytogenes* ICIS-280.

рий к лизоциму в контрольной среде без добавления ацетата аммония не превышала 50 мкг/мл (положительный контроль). В контрольной среде без лизоцима (отрицательный контроль) не отмечено ингибирования роста индикаторной культуры вплоть до максимальных концентраций добавляемого ацетата аммония (50 ммоль/л).

Таким образом, полученный результат согласуется с описанным эффектом обратимости реакции деацетилирования углеводов [11]. Избыток ацетата в среде смещает реакцию деацетилирования ПГ бактерий в сторону исходного (нативного) состояния, чувствительного к лизоциму. Обнаружено, что ацетат, продуцируемый бифидобактериями, индигенными для биотопа, в условиях физиологических значений кислотности также способен реализовать описанный эффект на модельной системе — тест-культуре де-N-ацетилирующих свой ПГ бактерий.

Характеристика лизоцимрезистентности индигенных бифидобактерий

Культивирование исследуемых штаммов индигенных бифидобактерий (ICIS-216, ICIS-310, ICIS-505) в среде с лизоцимом и ацетатом аммония не показало существенного отличия их показателей роста ($p > 0,05$) в контрольном бульоне от таковых в среде с добавлением максимальных использованных концентраций данных веществ (40 мкг/мл ли-

зоцима и 50 ммоль/л ацетата аммония): $1,07 \pm 0,05$ и $1,01 \pm 0,03$ ед. ОП у штамма ICIS-216; $0,72 \pm 0,07$ и $0,8 \pm 0,05$ ед. ОП у штамма ICIS-310; $0,63 \pm 0,2$ и $0,63 \pm 0,6$ ед. ОП у штамма ICIS-505 соответственно. Полученные данные свидетельствуют, что устойчивость к лизоциму у индигенных бифидобактерий не связана с наличием ацетата в среде, что согласуется с механизмом обеспечения их лизоцимрезистентности при О-ацетилировании ПГ — избыток ацетата в среде не оказывает подавляющего влияния на реакцию ацетилирования.

Обсуждение

Совокупность полученных данных свидетельствует, что продукция ацетата индигенными бифидобактериями обеспечивает не только уже известную устойчивость биотопа к ряду грамотрицательных патогенов, но и осуществляет дискриминацию неиндигенных грамположительных бактерий. При этом требуемый уровень данной продукции обеспечивается не только штаммами-носителями известных детерминант систем активного транспорта фруктозы, маннозы и рибозы, но и наблюдается у некоторых штаммов широко распространённого в кишечнике человека вида *B. bifidum*, не обладающего ими.

Проведённый анализ позволил нам составить схему механизма персистенции индигенных бифидобактерий (рис. 2):

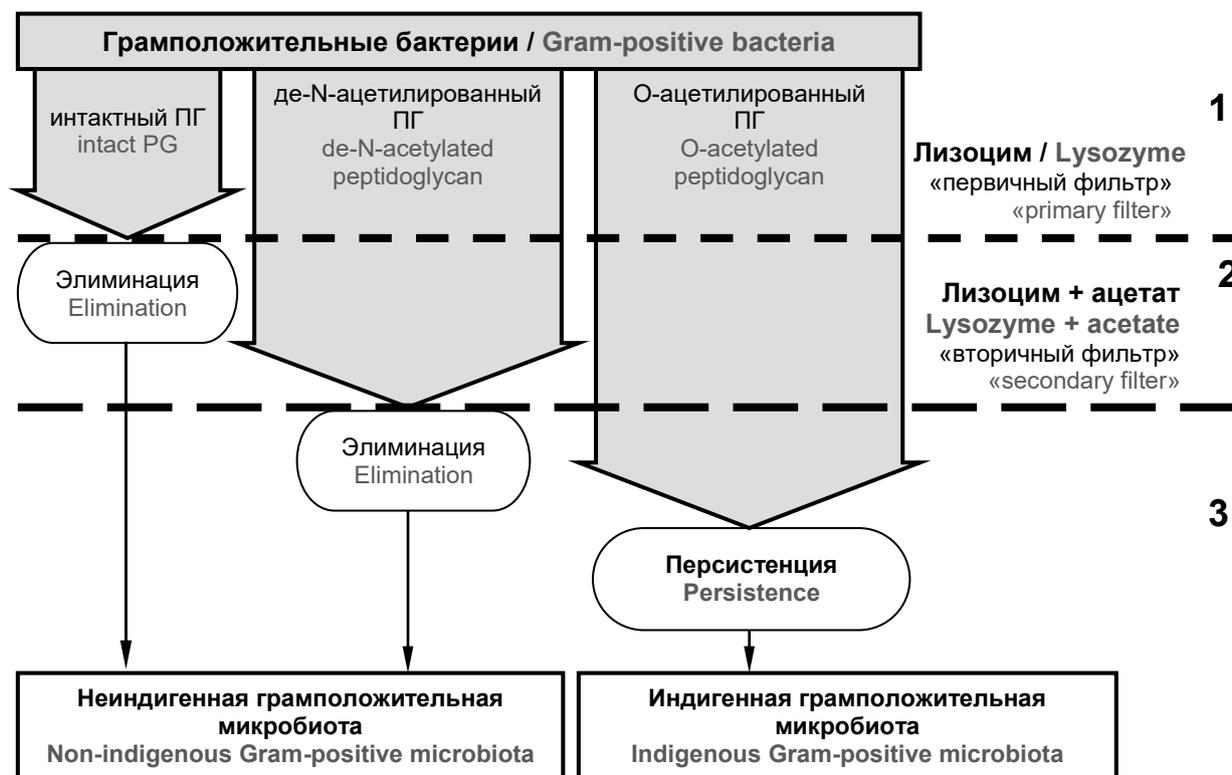


Рис. 2. Схема отбора грамположительных бактерий в толстом кишечнике по механизмам их лизоцим-резистентности.

Fig. 2. Selection of gram-positive bacteria in the large intestine by the mechanism of their lysozyme resistance.

1. Попадая в пищеварительный тракт, ПГ грамположительных бактерий напрямую контактирует с лизоцимом хозяина. Микроорганизмы с нативным, немодифицированным, ПГ элиминируются [15] — «первичный фильтр» микросимбионтов.

2. В толстом кишечнике бактерии, прошедшие лизоцимный, кислотный и протеолитический фильтры, в дополнение к лизоциму хозяина встречаются значительные количества ацетата, выделяемого индигенными бифидобактериями и их метаболитическими ассоциантами (бактероидами) [3]. Присутствие ацетата в среде смещает равновесие обратной реакции деацетилирования [11], катализируемой де-N-ацетилазой неиндигенной микробиоты в сторону немодифицированного ПГ бактерий, что оставляет его чувствительным к действию лизоцима [10], возвращаясь к элиминации его носителей — «вторичный фильтр» микросимбионтов.

К тому же, как показано нами, этот эффект наблюдался при физиологических концентрациях ацетата, образующихся в биотопе.

3. О-ацетилирование ПГ бактерий сохраняет свою работоспособность в присутствии ацетата и обеспечивает персистенцию реализующих его микроорганизмов, включая бифидобактерии [8], которые таким образом формируют пул индигенной микробиоты данного биотопа.

В связи с этим низкий уровень антилизоцимной активности, определяемый у бифидобактерий [2], оказывается закономерным, усиливая их селективное преимущество в толстом кишечнике. Таким образом, выделяясь в процессе катаболизма бифидобактериями, ацетат способствует изменению функционирования механизма персистенции бактерий-ассоциантов, выполняя по сути функцию регулятора лизоцимрезистентности в биотопе.

Заключение

Выявлен механизм персистенции индигенной бифидофлоры через альтернативную модификацию ПГ микроорганизмов, где ацетат является ключевым регулятором, определяющим доминантную роль бифидобактерий в кишечном биотопе хозяина, обеспечивая как первичную дискриминацию неиндигенных кишечных ассоциантов через блокирование де-N-ацетилирования их ПГ, так и сохранение индигенной грамположительной микробиоты с О-ацетилированием ПГ. Учёт роли подобного биохимического регулятора в биоценозе может способствовать повышению эффективности мер по коррекции и предупреждению дисбиотических состояний.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Ventura M., Turrone F., Lugli G.A., van Sinderen D. Bifidobacteria and humans: our special friends, from ecological to

- genomics perspectives. *J. Sci. Food Agric.* 2014; 94(2): 163–8. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6356>
2. Бухарин О.В., Перунова Н.Б., Иванова Е.В. *Бифидофлора при ассоциативном симбиозе человека*. Екатеринбург; 2014.
3. Rios-Covian D., Cuesta I., Alvarez-Buylla J.R., Ruas-Madiedo P., Gueimonde M., de Los Reyes-Gavilán C.G. *Bacteroides fragilis* metabolises exopolysaccharides produced by bifidobacteria. *BMC Microbiol.* 2016; 16(1): 150. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0773-9>
4. Fukuda S., Toh H., Taylor T.D., Ohno H., Hattori M. Acetate-producing bifidobacteria protect the host from enteropathogenic infection via carbohydrate transporters. *Gut Microbes.* 2012; 3(5): 449–54. <https://doi.org/10.4161/gmic.21214>
5. Vollmer W., Blanot D., de Pedro M.A. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* 2008; 32(2): 149–67. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x>
6. Андрищенко С.В., Перунова Н.Б., Бухарин О.В. Молекулярные механизмы взаимодействия бактерий с лизоцимом и их роль в микросимбиозе. *Успехи современной биологии.* 2015; 135(5): 453–63.
7. Pfeffer J.M., Strating H., Weadge J.T., Clarke A.J. Peptidoglycan O acetylation and autolysin profile of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. *J. Bacteriol.* 2006; 188(3): 902–8. <https://doi.org/10.1128/jb.188.3.902-908.2006>
8. Sakurai T., Hashikura N., Minami J., Yamada A., Odamaki T., Xiao J.Z. Tolerance mechanisms of human-residential bifidobacteria against lysozyme. *Anaerobe.* 2017; 47: 104–10. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.05.001>
9. Ho T.D., Williams K.B., Chen Y., Helm R.F., Popham D.L., Ellermeier C.D. Clostridium difficile extracytoplasmic function σ factor σ V regulates lysozyme resistance and is necessary for pathogenesis in the hamster model of infection. *Infect. Immun.* 2014; 82(6): 2345–55. <https://doi.org/10.1128/IAI.01483-13>
10. Rae C.S., Geissler A., Adamson P.C., Portnoy D.A. Mutations of the *Listeria monocytogenes* peptidoglycan N-deacetylase and O-acetylase result in enhanced lysozyme sensitivity, bacteriolysis, and hyperinduction of innate immune pathways. *Infect. Immun.* 2011; 79(9): 3596–606. <https://doi.org/10.1128/iai.00077-11>
11. Aragunde H., Biarnés X., Planas A. Substrate recognition and specificity of chitin deacetylases and related family 4 carbohydrate esterases. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19(2): 412. <https://doi.org/10.3390/ijms19020412>
12. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. *Статистические методы в микробиологических исследованиях*. Ленинград: Медгиз; 1962.
13. Sze M.A., Topçuoğlu B.D., Lesniak N.A., Ruffin M.T. 4th, Schloss P.D. Fecal short-chain fatty acids are not predictive of colonic tumor status and cannot be predicted based on bacterial community structure. *mBio.* 2019; 10(4): e01454-19.
14. Андрищенко С.В., Иванова Е.В., Перунова Н.Б., Бухарин О.В., Бекпергенова А.В. Генетическая характеристика адаптивного потенциала бифидобактерий биотопа дистального отдела кишечника человека. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2018; 95(4): 4–11. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-4-4-11>
15. Davis KM, Weiser JN. Modifications to the peptidoglycan backbone help bacteria to establish infection. *Infect. Immun.* 2011; 79(2): 562–70. <https://doi.org/10.1128/IAI.00651-10>

REFERENCES

1. Ventura M., Turrone F., Lugli G.A., van Sinderen D. Bifidobacteria and humans: our special friends, from ecological to genomics perspectives. *J. Sci. Food Agric.* 2014; 94(2): 163–8. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6356>

2. Bukharin O.V., Perunova N.B., Ivanova E.V. *Bifidoflora in Human Associative Symbiosis [Bifidoflora pri assotsiativnom simbioze cheloveka]*. Ekaterinburg; 2014. (in Russian)
3. Rios-Covian D., Cuesta I., Alvarez-Buylla J.R., Ruas-Madiedo P., Gueimonde M., de Los Reyes-Gavilán C.G. *Bacteroides fragilis* metabolises exopolysaccharides produced by bifidobacteria. *BMC Microbiol.* 2016; 16(1): 150. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0773-9>
4. Fukuda S., Toh H., Taylor T.D., Ohno H., Hattori M. Acetate-producing bifidobacteria protect the host from enteropathogenic infection via carbohydrate transporters. *Gut Microbes.* 2012; 3(5): 449–54. <https://doi.org/10.4161/gmic.21214>
5. Vollmer W., Blanot D., de Pedro M.A. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* 2008; 32(2): 149–67. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x>
6. Andryushchenko S.V., Perunova N.B., Bukharin O.V. Molecular mechanisms of bacterial interaction with lysozyme and their role in microbiocenosis. *Uspekhi sovremennoy biologii.* 2015; 135(5): 453–63. (in Russian)
7. Pfeffer J.M., Strating H., Weadge J.T., Clarke A.J. Peptidoglycan O acetylation and autolysin profile of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. *J. Bacteriol.* 2006; 188(3): 902–8. <https://doi.org/10.1128/jb.188.3.902-908.2006>
8. Sakurai T., Hashikura N., Minami J., Yamada A., Odamaki T., Xiao J.Z. Tolerance mechanisms of human-residential bifidobacteria against lysozyme. *Anaerobe.* 2017; 47: 104–10. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.05.001>
9. Ho T.D., Williams K.B., Chen Y., Helm R.F., Popham D.L., Ellermeier C.D. Clostridium difficile extracytoplasmic function σ factor σV regulates lysozyme resistance and is necessary for pathogenesis in the hamster model of infection. *Infect. Immun.* 2014; 82(6): 2345–55. <https://doi.org/10.1128/IAI.01483-13>
10. Rae C.S., Geissler A., Adamson P.C., Portnoy D.A. Mutations of the *Listeria monocytogenes* peptidoglycan N-deacetylase and O-acetylase result in enhanced lysozyme sensitivity, bacteriolysis, and hyperinduction of innate immune pathways. *Infect. Immun.* 2011; 79(9): 3596–606. <https://doi.org/10.1128/iai.00077-11>
11. Aragunde H., Biarnés X., Planas A. Substrate recognition and specificity of chitin deacetylases and related family 4 carbohydrate esterases. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19(2): 412. <https://doi.org/10.3390/ijms19020412>
12. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. *Statistic Methods in the Microbiological Research [Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyakh]*. Leningrad: Medgiz; 1962. (in Russian)
13. Sze M.A., Topçuoğlu B.D., Lesniak N.A., Ruffin M.T. 4th, Schloss P.D. Fecal short-chain fatty acids are not predictive of colonic tumor status and cannot be predicted based on bacterial community structure. *mBio.* 2019; 10(4): e01454-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.01454-19>
14. Andryushchenko S.V., Ivanova E.V., Perunova N.B., Bukharin O.V., Bekpergenova A.V. Genetic characteristics of the adaptive potential of bifidobacteria in the biotope of distal human intestine. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2018; 95(4): 4–11. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-4-4-11> (in Russian)
15. Davis K.M., Weiser J.N. Modifications to the peptidoglycan backbone help bacteria to establish infection. *Infect. Immun.* 2011; 79(2): 562–70. <https://doi.org/10.1128/IAI.00651-10>

Информация об авторах

Бухарин Олег Валерьевич — д.м.н., академик РАН, научный руководитель Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН, Оренбург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6039-5265>

Андрющенко Сергей Валерьевич[✉] — к.м.н., с.н.с. лаб. биомониторинга и молекулярно-генетических исследований Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН, Оренбург, Россия, rattus000@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-1691-7588>

Перунова Наталья Борисовна — д.м.н., проф. РАН, в.н.с. (с исполнением обязанностей зав. лаб.) лаб. биомониторинга и молекулярно-генетических исследований Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН, Оренбург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6352-8879>

Иванова Елена Валерьевна — д.м.н., доц., в.н.с. лаб. биомониторинга и молекулярно-генетических исследований Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН, Оренбург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4974-8947>

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

Статья поступила в редакцию 10.09.2020;
принята к публикации 20.03.2021;
опубликована 01.06.2021

Information about the authors

Oleg V. Bukharin — D. Sci. (Med.), Academician of the RAS, scientific director, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch of the RAS, Orenburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6039-5265>

Sergey V. Andryushchenko[✉] — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of biomonitoring and molecular genetic researches, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch of the RAS, rattus000@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-1691-7588>

Natalia B. Perunova — D. Sci. (Med.), Professor of RAS, leading researcher (with the duties of the Head of the laboratory), Laboratory of biomonitoring and molecular genetic researches, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch of the RAS, Orenburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6352-8879>

Elena V. Ivanova — D. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of biomonitoring and molecular genetic researches, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch of the RAS, Orenburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4974-8947>

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.

The article was submitted 10.09.2020;
accepted for publication 20.03.2021;
published 01.06.2021



Влияние антител к агглютиногенам 1 и 2, филаментозному гемагглютину и коклюшному токсину на формирование биоплёнок *Bordetella pertussis* на абиотическом субстрате

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

НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

Аннотация

Цель. Изучение влияния антител к агглютиногенам (АГ) -1 и -2, филаментозному гемагглютину (ФГА) и коклюшному токсину (КТ) на формирование биоплёнок штаммами *Bordetella pertussis* на абиотическом субстрате.

Материалы и методы. Использованы вакцинные и свежeweыделенные штаммы *B. pertussis*. В качестве инокулята для получения биоплёнок использовали культуры штаммов, выращенных на плотной питательной среде. Интенсивность образования биоплёнок в присутствии сывороток к АГ-1 и -2, ФГА и моноклональных антител (МКА) к S1-, S2- и S3-субъединицам КТ в круглодонных полистироловых 96-луночных планшетах оценивали окрашиванием 0,1% раствором генцианового фиолетового.

Результаты. Большинство исследованных штаммов были чувствительны к антителам, что проявлялось в полном подавлении образования биоплёнок. Все штаммы были чувствительны к сыворотке к АГ-1, сыворотке к ФГА, МКА к S2-субъединице КТ. К сыворотке к АГ-2 были чувствительны 3 из 4 исследованных штаммов, имеющих этот АГ в своем составе: № 475 (серовар 1.2.3), № 317 (серовар 1.2.3) и № 178 (серовар 1.2.0). Относительная устойчивость к сыворотке была выявлена только у штамма № 305 серовара 1.2.0, однако при минимальном её разведении интенсивность образования биоплёнки была в 1,8 раза ниже, чем в контроле. Штаммы № 703 (серовар 1.0.3) и № 287 (серовар 1.0.3), не имеющие АГ-2, были устойчивы к сыворотке. К МКА к S1- и S3-субъединицам КТ были чувствительны, соответственно, 4 и 5 из 6 использованных штаммов. Штамм № 305 был устойчив к МКА к S1- и S3-субъединицам, а штамм № 287 — к МКА к S1-субъединице. При этом при минимальном разведении МКА интенсивность образования биоплёнок была, соответственно, в 2 и 1,8 раза ниже, чем в контроле.

Заключение. Приведённые данные свидетельствуют о подавлении роста биоплёнок штаммов *B. pertussis* антителами как к поверхностным структурам микробной клетки (АГ-1 и -2, ФГА), так и к S1-, S2- и S3-субъединицам КТ.

Ключевые слова: штаммы *B. pertussis*, биоплёнки, сыворотка к агглютиногену, сыворотка к филаментозному гемагглютину, моноклональные антитела, коклюшный токсин

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

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

Для цитирования: Зайцев Е.М., Брицина М.В., Озерецковская М.Н., Мерцалова Н.У., Бажанова И.Г. Влияние антител к агглютиногенам 1 и 2, филаментозному гемагглютину и коклюшному токсину на формирование биоплёнок *Bordetella pertussis* на абиотическом субстрате. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(3):283–289.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-110>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-110>

Effect of antibodies to agglutinogens 1 and 2, filamentous hemagglutinin and pertussis toxin on formation of *Bordetella pertussis* biofilms on abiotic substrate

Eugene M. Zaytsev[✉], Marina V. Britsina, Maria N. Ozeretskovskaya, Natalia U. Mertsalova, Irina G. Bazhanova

I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Abstract

Aim. Study of the effect of antibodies to agglutinogens 1 and 2, filamentous hemagglutinin (FHA) and pertussis toxin (PT) on the formation of biofilms by *Bordetella pertussis* strains on the abiotic substrate.

Materials and methods. Vaccine-derived and freshly isolated strains of *B. pertussis* were used. Cultures of strains grown on a dense nutrient medium were used as an inoculum for obtaining biofilms. The intensity of biofilm formation in round-bottomed polystyrene 96-well plates in the presence of antisera to agglutinogens 1 and 2, antiserum to FHA, and monoclonal antibodies (MCA) to the S1, S2, and S3 subunits of PT was evaluated by staining with 0.1% gentian-violet solution.

Results. Most of the studied strains were sensitive to antibodies, which was manifested in complete suppression of biofilm formation. All strains were sensitive to antiserum to agglutininogen 1, antiserum to FHA, and MCA to the S2 subunit of KT. Three out of 4 studied strains with this agglutininogen in their composition were sensitive to antiserum to agglutininogen 2: No. 475 (serotype 1.2.3), No. 317 (serotype 1.2.3) and No. 178 (serotype 1.2.0). Relative resistance to antiserum was detected only in serotype 1.2.0 strain No. 305, but with minimal dilution, the intensity of biofilm formation was 1.8 times lower than in the control group. Strains No. 703 (serotype 1.0.3) and No. 287 (serotype 1.0.3) that did not have agglutininogen 2 were resistant to antiserum. Four and 5 out of the 6 strains used were sensitive to the S1 and S3 subunits of PT, respectively. Strain No. 305 was resistant to MCA to the S1 and S3 subunits, and strain No. 287 to MCA to the S1 subunit. At the same time, the intensity of biofilm formation was 2 and 1.8 times lower than in the control at the minimum MCA dilution.

Conclusion. These data indicate that the growth of biofilms of *B. pertussis* strains is suppressed by antibodies both to the surface structures of the microbial cell (agglutinogens 1 and 2, FHA) and to the S1, S2 and S3 subunits of PT.

Keywords: *B. pertussis* strains, biofilms, antisera to agglutininogen 1 and 2, antiserum to filamentous hemagglutinin, monoclonal antibodies, pertussis toxin

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

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

For citation: Zaytsev E.M., Britsina M.V., Ozeretskovskaya M.N., Mertsalova N.U., Bazhanova I.G. Effect of antibodies to agglutinogens 1 and 2, filamentous hemagglutinin and pertussis toxin on formation of *Bordetella pertussis* biofilms on abiotic substrate. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(3):283–289.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-110>

Введение

Эпидемический процесс коклюшной инфекции продолжается во всем мире, в том числе в странах с высоким уровнем вакцинации. Заболеваемость коклюшем в последние годы составляет 10–40 случаев на 100 тыс. жителей в год и наиболее высока у детей младшего возраста. Рост заболеваемости регистрируется также среди подростков и взрослых, являющихся источником передачи инфекции неиммунизированным младенцам, которые подвергаются риску тяжелых форм заболевания и смерти [1–3].

Рост заболеваемости коклюшем связывают с рядом факторов, среди которых выделяют недоста-

точную эффективность существующих бесклеточных коклюшных вакцин, а также мутации в генах возбудителя, кодирующих основные факторы вирулентности *Bordetella pertussis*, что привело к появлению циркулирующих штаммов, отличающихся повышенной вирулентностью [4, 5]. Одной из вероятных причин продолжающегося эпидемического процесса коклюшной инфекции также могут быть биоплёнки *B. pertussis*.

Согласно современным представлениям, биоплёнки представляют собой сообщества бактериальных клеток, прикрепленных к поверхности и друг к другу и заключенных в полимерный матрикс. Компоненты матрикса защищают бактерии

в биоплёнке от повреждающих факторов внешней среды [6]. Этапы формирования биоплёнок включают начальное прикрепление к поверхности отдельных клеток, их рост с образованием монослоя с последующим образованием микроколоний и полимерного матрикса. Первичное прикрепление планктонных бактерий к абиотическим поверхностям является обратимым процессом, в реализации которого принимают участие физико-химические взаимодействия, в частности, электростатические и гидрофобные. Переход к необратимой связи происходит с участием адгезинов, расположенных на поверхности микробных клеток и специфичных для каждого вида бактерий [7].

Микробы рода *Bordetella*, как и другие бактерии, обладают способностью к формированию биоплёнок на абиотических и биотических поверхностях. *B. pertussis* продуцирует ряд вирулентных факторов, определяющих патогенез коклюшной инфекции. Условно их можно разделить на адгезины (фимбрии, пертактин, фактор колонизации трахеи, филаментозный гемагглютинин (ФГА)) и токсины (коклюшный токсин (КТ), дермонекротический токсин, трахеальный цитотоксин, аденилатциклаза, липополисахарид).

Имеются данные о значении адгезинов *B. pertussis* и КТ для прикрепления к клеткам респираторного тракта. Однако значение этих факторов для формирования биоплёнок на биотических и абиотических поверхностях, а также чувствительность биоплёнок *B. pertussis* к иммунным факторам пока изучена недостаточно, по данной проблеме имеются лишь единичные публикации [8].

Цель работы — изучение влияния антител к агглютиногенам (АГ) -1 и -2, ФГА и КТ на формирование биоплёнок *B. pertussis* на абиотическом субстрате.

Материалы и методы

В опытах использовали «вакцинные» штаммы *B. pertussis*, выделенные от больных коклюшем в 1950–1960-е гг., использующиеся в России для изготовления корпускулярных коклюшных вакцин: штамм № 475 (серовар 1.2.3), штамм № 305 (серовар 1.2.0), штамм № 703 (серовар 1.0.3), а также выделенные в России от больных коклюшем в 2001–2010 гг.: штамм № 178 (серовар 1.2.0), штамм № 287 (серовар 1.0.3) и штамм № 317 (серовар 1.2.3). В опытах использовали сыворотки диагностические коклюшные к АГ-1 и -2 (Филиал «Медгамал» НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи), мышиную сыворотку к ФГА (кат. номер JN1H-11), мышиную моноклональные антитела (МКА) к субъединицам S1 (кат. номер 99/506), S2 (кат. номер 99/538) и S3 (кат. номер 99/542) КТ (National Institute for Biological Standards and Control, Великобритания). Контроль морфологических, серологических и культураль-

ных свойств штаммов проводили в соответствии с методическими указаниями¹.

В качестве инокулята для получения биоплёнок использовали ночные культуры штаммов, выращенных на плотной питательной среде («Бордетеллагар» — питательная среда для культивирования и выделения коклюшного микроба сухая, ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). Суспензию бактерий культивировали в 96-луночных пластиковых планшетах («Nunc») в жидкой синтетической питательной среде в соответствии с ранее описанным методом [9]. Культуры штаммов в жидкой синтетической питательной среде в концентрации 10 МОЕ в объёме 100 мкл вносили в лунки планшетов. После этого в лунки добавляли по 100 мкл антител. Сыворотки к АГ-1 использовали в разведениях 1 : 5000, 1 : 10 000, 1 : 20 000, 1 : 4000, к АГ-2 — 1 : 2500, 1 : 5000, 1 : 10 000, 1 : 20 000. Сыворотку к ФГА и МКА к субъединицам КТ использовали в разведениях 1 : 20, 1 : 200, 1 : 400 и 1 : 800. Отрицательным контролем служили сыворотки неиммунных мышей и кроликов в разведениях 1 : 20 и 1 : 2500 соответственно.

Планшеты накрывали крышкой и помещали в термостат при 37°C в горизонтальном положении на ровную поверхность на 24 ч. Интенсивность образования биоплёнок (ИОБ) в планшетах оценивали по окрашиванию 0,1% раствором генцианового фиолетового по показателям оптической плотности (ОП) окрашенного растворителя по отношению к негативному контролю (ОП_к = 0,047) как плотные (ОП ≥ 0,188), умеренные (0,094 ≤ ОП < 0,188), слабые (0,078 ≤ ОП < 0,094), отсутствие биоплёнок (ОП < 0,078).

Результаты оценивали по значениям титра сывороток, которые определяли как наибольшие их разведения, подавляющие рост биоплёночных культур по сравнению с контролем (слабые биоплёнки или их отсутствие). Формирование плотных и умеренных биоплёнок в присутствии антител рассматривали как устойчивость к антителам. Для достоверного обчёта результатов использовали 5 лунок на один опытный образец и рассчитывали среднюю величину ОП опытного образца и удвоенную ошибку. Сравнения проводили по критерию *t* Стьюдента [10].

Результаты

Результаты исследования чувствительности вакцинных и свежевыделенных штаммов *B. pertussis* к антителам к антигенам возбудителя коклюша приведены в **таблице**.

Контрольные культуры (не содержавшие антител) исследованных штаммов отличались по ИОБ.

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

Чувствительность вакцинных и свежeweделенных штаммов *B. pertussis* к антителам к антигенам коклюшного микроба
Sensitivity of vaccine and freshly isolated *B. pertussis* strains to antibodies to antigens of pertussis microbe

Параметр Parameter		Штаммы (серовар) / Strains (serotype)					
		вакцинные / vaccine			свежeweделенные / freshly isolated		
		№ 475 (1.2.3)	№ 305 (1.2.0)	№ 703 (1.0.3)	№ 317 (1.2.3)	№ 178 (1.2.0)	№ 287 (1.0.3)
Контроль Control	ОП optical density	0,138 ± 0,020	0,242 ± 0,031	0,232 ± 0,042	0,195 ± 0,012	0,193 ± 0,021	0,192 ± 0,013
	ИОБ intensity of biofilm formation	Умеренная Medium	Плотная Dense	Плотная Dense	Плотная Dense	Плотная Dense	Плотная Dense
Сыворотка к АГ-1 Antiserum to agglutinin 1	ОП optical density	0,072 ± 0,006	0,089 ± 0,010	0,066 ± 0,005	0,089 ± 0,003	0,087 ± 0,009	0,093 ± 0,004
	ИОБ intensity of biofilm formation	Нет No	Слабая Weak	Нет No	Слабая Weak	Слабая Weak	Слабая Weak
	титр антител serum dilution	1 : 20 000*	1 : 10 000*	1 : 10 000*	1 : 5000*	1 : 10 000*	1 : 5000*
Сыворотка к АГ-2 Antiserum to agglutinin 2	ОП optical density	0,076 ± 0,005	134 ± 0,013	0,212 ± 0,032	0,092 ± 0,004	0,098 ± 0,011	0,174 ± 0,013
	ИОБ intensity of biofilm formation	Нет No	Умеренная Medium	Плотная Dense	Слабая Weak	Слабая Weak	Умеренная Medium
	титр антител serum dilution	1 : 10 000*	1 : 2500**	**	1 : 2500*	1 : 2500*	**
Сыворотка к ФГА Antiserum to FHA	ОП optical density	0,056 ± 0,003	0,053 ± 0,002	0,054 ± 0,009	0,0052 ± 0,002	0,054 ± 0,007	0,062 ± 0,003
	ИОБ intensity of biofilm formation	Нет No	Нет No	Нет No	Нет No	Нет No	Нет No
	титр антител serum dilution	1 : 200*	1 : 20*	1 : 20*	1 : 20*	1 : 20*	1 : 20*
МКА к S1-субъединице КТ MCA to the S1 subunit of PT	ОП optical density	0,082 ± 0,006	0,121 ± 0,006	0,060 ± 0,002	0,075 ± 0,001	0,077 ± 0,019	0,105 ± 0,007
	ИОБ intensity of biofilm formation	Слабая Weak	Умеренная Medium	Нет No	Нет No	Нет No	Умеренная Medium
	титр антител MCA dilution	1 : 200*	1 : 20**	1 : 20*	1 : 20*	1 : 20*	1 : 20**
МКА к S2-субъединице КТ MCA to the S2 subunit of PT	ОП optical density	0,073 ± 0,002	0,080 ± 0,004	0,055 ± 0,001	0,056 ± 0,002	0,059 ± 0,003	0,071 ± 0,002
	ИОБ intensity of biofilm formation	Нет No	Слабая Weak	Нет No	Нет No	Нет No	Нет No
	титр антител MCA dilution	1 : 200*	1 : 20*	1 : 20*	1 : 20*	1 : 20*	1 : 20*
МКА к S3-субъединице КТ MCA to the S3 subunit of PT	ОП optical density	0,079 ± 0,005	0,119 ± 0,013	0,058 ± 0,002	0,056 ± 0,002	0,055 ± 0,002	0,065 ± 0,003
	ИОБ intensity of biofilm formation	Нет No	Умеренная Medium	Нет No	Нет No	Нет No	Нет No
	титр антител MCA dilution	1 : 200*	1 : 20**	1 : 20*	1 : 20*	1 : 20*	1 : 20*

Примечание. *Подавление роста биоплёнок (различия между опытными образцами и контролем статистически достоверны ($p < 0,05$); **отсутствие подавления роста биоплёнок.

Note. *Suppression of biofilm growth (differences between experimental samples and control are statistically significant ($p < 0.05$); **no suppression of biofilm growth.

Штамм № 475 формировал умеренные биоплёнки, а штаммы № 305, 703, 317, 178 и 287 — плотные.

Все исследованные штаммы проявляли чувствительность к антисыворотке к АГ-1. Титры антисыворотки к АГ-1, подавлявшие рост биоплёнок со штаммом № 475, составляли 1 : 20 000, со штаммами № 305, 703 и 178 — 1 : 10 000, а со штаммами № 287 и 317 — 1 : 5000.

К сыворотке к АГ-2 были чувствительны 3 штамма: № 475 (серовар 1.2.3), 317 (серовар 1.2.3) и 178 (серовар 1.2.0). Вакцинный штамм № 475 отличался высокой чувствительностью к сыворотке, титр которой составлял 1:10 000. Титры сыворотки со штаммами № 317 и 178 составляли 1 : 2500. Штамм № 305 (серовар 1.2.0) проявлял устойчивость к сыворотке и формировал умеренные или плотные биоплёнки в зависимости от её разведения, однако при разведении 1 : 2500 ИОБ была в 1,8 раза ниже, чем в контроле. Штаммы № 703 (серовар 1.0.3) и 287 (серовар 1.0.3) были устойчивыми к сыворотке и формировали умеренные или плотные биоплёнки.

Все штаммы были чувствительны к антисыворотке к ФГА, титр которой со штаммом № 475 составлял 1 : 200, а с остальными штаммами — 1 : 20.

МКА к S1-субъединице КТ подавляли рост биоплёнок штамма № 475 в разведении 1 : 200, а штаммов № 703, 317 и 178 — в разведении 1 : 20. Штаммы № 305 и 287 были устойчивы к МКА к S1-субъединице и формировали умеренные или плотные биоплёнки, однако при разведении МКА 1 : 20 ИОБ была в 2 раза ниже, чем в контроле культуры.

Все штаммы были чувствительны к МКА к S2-субъединице КТ. Титр МКА со штаммом № 475 составлял 1 : 200, а с остальными штаммами — 1 : 20.

К МКА к S3-субъединице КТ были чувствительны у 5 из 6 исследованных штаммов. Титр МКА со штаммом № 475 составлял 1 : 200, а со штаммами № 703, 317, 178 и 287 — 1 : 20. Штамм № 305 был устойчив к МКА и формировал умеренные или плотные биоплёнки. При разведении МКА 1 : 20 ИОБ была в 2 раза ниже, чем в контроле.

Обсуждение

Механизмы образования биоплёнок *B. pertussis* и влияние на этот процесс иммунных факторов мало изучены и могут быть связаны с эффекторными механизмами клеточного и гуморального иммунитета [8]. Нами исследована чувствительность биоплёнок основных сероваров (1.0.3, 1.2.0 и 1.2.3) вакцинных и свежeweделенных штаммов *B. pertussis* к сывороткам к АГ-1 и -2, ФГА и МКА к S1-, S2- и S3-субъединицам КТ. Результаты опытов показали, что большинство исследованных штаммов были чувствительными к антителам, что проявлялось в полном подавлении образования биоплёнок. Все

штаммы были чувствительными к сыворотке к АГ-1 и ФГА, МКА к S2-субъединице КТ. К сыворотке к АГ-2 были чувствительными 3 из 4 исследованных штаммов, имеющих этот АГ в своем составе: № 475 (серовар 1.2.3), № 317 (серовар 1.2.3) и № 178 (серовар 1.2.0). Относительная устойчивость к сыворотке была выявлена только у штамма № 305 серовара 1.2.0, однако при минимальном её разведении ИОБ была в 1,8 раза ниже, чем в контроле культуры. Штаммы № 703 (серовар 1.0.3) и 287 (серовар 1.0.3), не имеющие АГ-2, были устойчивы к сыворотке. К МКА к S1- и S3-субъединицам КТ были чувствительны, соответственно, 4 и 5 из 6 использованных штаммов. Штамм № 305 был устойчив к МКА к S1- и S3-субъединицам, а штамм № 287 — к МКА к S1-субъединице. При этом при минимальном разведении МКА ИОБ была в 2 и 1,8 раза соответственно ниже, чем в контроле культуры.

По отношению ко всем штаммам выявлена зависимость ИОБ от разведения антител. Увеличение разведения антител сопровождалось усилением роста биоплёнок. Относительная устойчивость штамма № 305 к сыворотке к АГ-2 и к МКА к S1- и S3-субъединицам КТ, а штамма № 287 к S1-субъединице КТ может быть обусловлена различным соотношением между уровнем экспрессии этих факторов и уровнем антител в составе использованных препаратов.

В целом мы не обнаружили существенных различий между исследованными вакцинными и свежeweделенными штаммами по чувствительности к противокклюшным антителам. Исключение составил вакцинный штамм № 475, отличавшийся более высокой, по сравнению с другими штаммами, чувствительностью к антителам. Высокую чувствительность штамма № 475 к антителам можно объяснить относительно низкой, в отличие от остальных штаммов, ИОБ.

Результаты опытов позволяют сделать определённые выводы о значении АГ-1 и -2, ФГА и S1-, S2- и S3-субъединиц КТ для биоплёнокообразования *B. pertussis* на абиотическом субстрате. Подавление образования биоплёнок сыворотками к АГ-2 и ФГА согласуется с современными представлениями о их значении в патогенезе коклюша. Основным адгезином *B. pertussis* является ФГА, участвующий в процессах адгезии и колонизации респираторного тракта. В адгезии *B. pertussis* на клетках респираторного тракта принимают участие также фимбриальные белки, состоящие из двух основных субъединиц — Fim2 и Fim3, соответствующих АГ-2 и -3. Подавление образования биоплёнок сыворотками к ФГА и АГ-2 подтверждает их значение как адгезинов и согласуется с данными других авторов [11]. Влияние сывороток к ФГА на рост биоплёнок может быть связано не только с подавлением адгезии планктонных клеток на субстрате, но также с их

прикреплении к формирующейся биоплёнке [12].

АГ-1 является поверхностной структурой микробной клетки, однако, в отличие от АГ-2 и -3, не ассоциирован с фимбриями. Значение этого антигена для патогенеза коклюша не вполне ясно, однако известно его значение как протективного антигена. В частности, было показано, что защитная активность цельноклеточных коклюшных вакцин коррелирует с содержанием в клетке АГ-1, -2, -3 [13]. Полученные нами данные указывают на значение АГ-1 для формирования биоплёнок и могут предполагать его роль в качестве адгезина.

Интерес представляют результаты влияния МКА к субъединицам КТ на образование биоплёнок. КТ является одним из основных факторов патогенности *B. pertussis* и обуславливает значительную часть симптомов заболевания у больных коклюшем. КТ является экзотоксином, секретируемым микробной клеткой, представляет собой белок с молекулярной массой 117 кДа. Молекула токсина состоит из двух функциональных частей (А и В) и 5 структурных единиц (S1, S2, S3, S4 и S5). Фрагмент А токсина соответствует структурной S1-субъединице, которая обладает ферментативной активностью и катализирует АДФ-зависимое рибозилирование белка клеточной мембраны трансдуцина. Последнее приводит к нарушению контроля функционирования аденилатциклазы, накоплению цАМФ и нарушению функции клеток. Фрагмент В молекулы КТ состоит из S2-, S3-, S4- и S5-субъединиц и отвечает за связывание с рецепторами клеток-мишеней [14, 15]. Подавление роста биоплёнок МКА к S2- и S3-субъединицам КТ может указывать на их роль в качестве факторов адгезии. Однако МКА к S1-субъединице также подавляли рост биоплёнок. В связи с этим нельзя исключить роль КТ в формировании биопленок как фактора «поверхностного кондиционирования». По данным ряда авторов, «поверхностное кондиционирование» является одним из факторов образования биоплёнок и заключается в адсорбции на субстрате белков, липидов, полисахаридов и других молекул внеклеточного матрикса, что приводит к модификации его поверхности и влияет на процессы адгезии микроорганизмов [7]. Можно предположить, что связывание МКА к S1-субъединице с молекулой КТ может приводить к конформационным изменениям его молекулы, меняющих его способность к связыванию с субстратом.

В целом приведённые данные указывают на значение в формировании биоплёнок как поверхностных структур микробных клеток (ФГА, АГ-1 и -2), так и секретируемого ими КТ. Полученные результаты свидетельствуют о сложности процесса образования и иммунного подавления биоплёнок *B. pertussis* и целесообразности дальнейших исследований этой области, в частности изучение значения других патогенных факторов коклюшного микроба.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Barkoff A.M., He Q. Molecular epidemiology of *Bordetella pertussis*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019; 1183: 19–33. https://doi.org/10.1007/5584_2019_402
2. Nieves D.J., Heininger U. *Bordetella pertussis*. *Microbiol. Spectr.* 2016; 4(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.EI10-0008-2015>
3. Борисова О.Ю., Гадуа Н.Т., Пименова А.С., Петрова М.С., Попова О.П., Алешкин В.А. и др. Структура популяции штаммов возбудителя коклюша на территории России. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016; 15(4): 22–8.
4. Субботина К.А., Фельдблюм И.В., Кочергина Е.А., Лехтина Н.А. Эпидемиологическое обоснование к изменению стратегии и тактики специфической профилактики коклюша в современных условиях. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2019; 18(2): 27–33. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-2-27-33>
5. Di Mattia G., Nicolai A., Frassanito A., Petrarca L., Nenna R., Midulla F. Pertussis: new preventive strategies for an old disease. *Paediatr. Respir. Rev.* 2019; 29: 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2018.03.011>
6. Del Pozo J.L. Biofilm-related disease. *Expert Rev. Anti Infect Ther.* 2018; 16(1): 51–65. <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1417036>
7. Dunne W.M.Jr. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15(2): 155–66. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.155-166.2002>
8. Cattelan N., Dubey P., Arnal L., Yantorno O.M., Deora R. *Bordetella* biofilms: a lifestyle leading to persistent infections. *Pathog. Dis.* 2016; 74(1): ftv108. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv108>
9. Зайцев Е.М., Брицина М.В., Озерцовская М.Н., Мерцалова Н.У., Бажанова И.Г. Культивирование биопленок *Bordetella pertussis* на абиотическом субстрате. *Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунологии*. 2019; 96(1): 49–53. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-1-49-53>
10. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. *Статистические методы в микробиологических исследованиях*. Ленинград; 1962.
11. Scheller E.V., Cotter P.A. *Bordetella* filamentous hemagglutinin and fimbriae: critical adhesins with unrealized vaccine potential. *Pathog. Dis.* 2015; 73(8): ftv079. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv079>
12. Serra D.O., Conover M.S., Arnal L., Sloan G.P., Rodriguez M.E., Yantorno O.M., et al. FHA-mediated cell-substrate and cell-cell adhesions are critical for *Bordetella pertussis* biofilm formation on abiotic surfaces and in the mouse nose and the trachea. *PLoS One*. 2011; 6(12): e28811. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028811>
13. Чупринина П.П., Алексеева И.А. Возможность повышения иммуногенной активности и стабильности цельноклеточного коклюшного компонента комбинированных вакцин. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2014; (2): 89–95.
14. Scanlon K., Skerry C., Carbonetti N. Role of major toxin virulence factors in pertussis infection and disease pathogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019; 1183: 35–51. https://doi.org/10.1007/5584_2019_403
15. Carbonetti N.H. Contribution of pertussis toxin to the pathogenesis of pertussis disease. *Pathog. Dis.* 2015; 73(8): ftv073. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv073>

REFERENCES

1. Barkoff A.M., He Q. Molecular epidemiology of *Bordetella pertussis*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019; 1183: 19–33. https://doi.org/10.1007/5584_2019_402
2. Nieves D.J., Heininger U. *Bordetella pertussis*. *Microbiol. Spectr.* 2016; 4(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.EI10-0008-2015>

3. Borisova O.Yu., Gadua N.T., Pimenova A.S. et al. Structure of population of strains of the *Bordetella pertussis* in the Russia. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika*. 2016; 4(89): 22–8. (in Russian)
4. Subbotina K.A., Fel'dblyum I.V., Kochergina E.A., Lekhtina N.A. Epidemiological rationale for changing the strategy and tactics of vaccination of pertussis in current conditions. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika*. 2019; 18(2): 27–33. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-2-27-33> (in Russian)
5. Di Mattia G., Nicolai A., Frassanito A., Petrarca L., Nenna R., Midulla F. Pertussis: New preventive strategies for an old disease. *Paediatr. Respir. Rev.* 2019; 29: 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2018.03.011>
6. Del Pozo J.L. Biofilm-related disease. *Expert Rev. Anti Infect Ther.* 2018; 16(1): 51–65. <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1417036>
7. Dunne W.M.Jr. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15(2): 155–66. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.155-166.2002>
8. Cattelan N., Dubey P., Arnal L., Yantorno O.M., Deora R. *Bordetella* biofilms: a lifestyle leading to persistent infections. *Pathog. Dis.* 2016; 74(1): ftv108. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv108>
9. Zaytsev E.M., Britsina M.V., Ozeretskoykaya M.N., Mertsalova N.U., Bazhanova I.G. Cultivation of *Bordetella pertussis* biofilms on abiotic substrate. *Zhurnal mikrobiologii i immunologii i immunobiologii*. 2019; 96(1): 49–53. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-1-49-53> (in Russian)
10. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. *Statistical Methods in Microbiological Research [Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyakh]*. Leningrad; 1962. (in Russian)
11. Scheller E.V., Cotter P.A. *Bordetella* filamentous hemagglutinin and fimbriae: critical adhesins with unrealized vaccine potential. *Pathog. Dis.* 2015; 73(8): ftv079. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv079>
12. Serra D.O., Conover M.S., Arnal L., Sloan G.P., Rodriguez M.E., Yantorno O.M., et al. FHA-mediated cell-substrate and cell-cell adhesions are critical for *Bordetella pertussis* biofilm formation on abiotic surfaces and in the mouse nose and the trachea. *PLoS One*. 2011; 6(12): e28811. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028811>
13. Chuprinina R.P., Alekseeva I.A. The possibility of increasing the potency and stability of whole-cell pertussis component of combined vaccines. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika*. 2014; (2): 89–95.
14. Scanlon K., Skerry C., Carbonetti N. Role of major toxin virulence factors in pertussis infection and disease pathogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019; 1183: 35–51. https://doi.org/10.1007/5584_2019_403
15. Carbonetti N.H. Contribution of pertussis toxin to the pathogenesis of pertussis disease. *Pathog. Dis.* 2015; 73(8): ftv073. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv073>

Информация об авторах

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

Брицина Марина Васильевна — к.б.н., в.н.с. лаб. иммуномодуляторов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://www.orcid.org/0000-0002-3044-0790>

Озерецковская Мария Николаевна — к.м.н., в.н.с. лаб. иммуномодуляторов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://www.orcid.org/0000-0001-9809-4217>

Мерцалова Наталья Устиновна — к.б.н., в.н.с. лаб. иммуномодуляторов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://www.orcid.org/0000-0002-9072-2538>

Бажанова Ирина Глебовна — к.б.н., в.н.с. лаб. иммуномодуляторов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://www.orcid.org/0000-0003-1404-1498>

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

Статья поступила в редакцию 09.12.2020;
принята к публикации 04.02.2021;
опубликована 28.05.2021

Information about the authors

Eugene M. Zaytsev[✉] — D. Sci. (Med.), Head, Laboratory of immunomodulators, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, pertussis@yandex.ru, <https://www.orcid.org/0000-0002-4813-9074>

Marina V. Britsina — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of immunomodulators, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://www.orcid.org/0000-0002-3044-0790>

Maria N. Ozeretskoykaya — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of immunomodulators, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://www.orcid.org/0000-0001-9809-4217>

Natalia U. Mertsalova — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of immunomodulators, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://www.orcid.org/0000-0002-9072-2538>

Irina G. Bazhanova — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of immunomodulators, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://www.orcid.org/0000-0003-1404-1498>

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.

The article was submitted 09.12.2020;
accepted for publication 04.02.2021;
published 28.05.2021

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-39>

Биологические свойства и генетическая характеристика экспериментальных диагностических бактериофагов *Vibrio cholerae*

Погожова М.П.[✉], Гаевская Н.Е., Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Аноприенко А.О., Романова Л.В., Тюрина А.В.

Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия

Аннотация

Актуальность. В настоящее время проводится работа по конструированию новых диагностических и профилактических препаратов на основе бактериофагов, поэтому актуально изучение биологических свойств холерных фагов наравне с их генетической структурой. Эта информация необходима для прогнозирования жизненного цикла фага и оценки перспектив практического использования в экспериментальной деятельности, фагодиагностике или фагопрофилактике.

Материалы и методы. Наличие или отсутствие генов, характерных для умеренных бактериофагов, проверяли при помощи созданной авторами базы данных и программного обеспечения «PhageAnalyzer», позволяющего проводить быстрый анализ данных полногеномного секвенирования бактериофагов и прогнозировать их жизненный цикл.

Результаты и обсуждение. Морфологическая структура экспериментальных диагностических холерных фагов представлена головчатými бактериофагами различных морфогрупп. Негативные колонии фагов различались по диаметру, форме и степени прозрачности. В геномах бактериофагов Rostov-1, Rostov-6, Rostov 7 и Rostov M3 генетических детерминант факторов резистентности и токсинов не обнаружено. В результате филогенетического анализа определено, что исследованные холерные экспериментальные бактериофаги имеют сходство с головчатými фагами из рода *Vibrio*, но являются уникальными, т.к. находятся «вне кластерных групп». *Vibrio* фаги Rostov-1 и Rostov M3 являются литическими. У холерных фагов Rostov-6 и Rostov 7 найдены гены, характерные для умеренных бактериофагов.

Заключение. Экспериментальный холерный бактериофаг Rostov-1 может быть использован для дифференциации холерного вибриона O1 серогруппы биовара El Tor, а *Vibrio* фаг Rostov M3 — для биовара Classical. Оба бактериофага являются литическими и перспективными компонентами для создания профилактических препаратов против холеры. *Vibrio* фаги Rostov-6 и Rostov 7 могут быть успешно использованы только в экспериментальной деятельности, а также при мониторинге холерных вибрионов из окружающей среды. Полные геномные последовательности зарегистрированы и доступны в международной базе GenBank (NCBI).

Ключевые слова: холерные бактериофаги, *Vibrio phage*, биологические свойства, полногеномное секвенирование

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

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

Для цитирования: Погожова М.П., Гаевская Н.Е., Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Аноприенко А.О., Романова Л.В., Тюрина А.В. Биологические свойства и генетическая характеристика экспериментальных диагностических бактериофагов *Vibrio cholerae*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(3):290–297. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-39>

Biological properties and genetic characteristics of experimental diagnostic *Vibrio cholerae* bacteriophages

Marina P. Pogozhova[✉], Natalya E. Gayevskaya, Alexey S. Vodopyanov, Ruslan V. Pisanov, Anna O. Anoprienko, Lyudmila V. Romanova, Anna V. Tyurina

Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, Russia

Abstract

Background. Currently, the researches focused on the design of new diagnostic and preventive preparations based on bacteriophages are underway, so it is important to study the biological properties of cholera phages along with their genetic structure. This information is necessary to predict the phage life cycle and assess the prospects of its practical use in experiments, phagodiagnosics and phagoprophylaxis.

Materials and methods. The presence or absence of genes characteristic of temperate bacteriophages was tested using a database created by the authors and developed software "PhageAnalyzer", which allows for rapid analysis of bacteriophage genome-wide sequencing data and prediction of their life cycle.

Results and discussion. The morphological structure of experimental diagnostic cholera phages is represented by head bacteriophages of various morphogroups. Negative colonies phage differed in diameter, shape and degree of transparency. No genetic determinants of resistance factors and toxins have been found in the genomes of bacteriophages Rostov-1, Rostov-6, Rostov 7, and Rostov M3. Results of phylogenetic analysis demonstrated that the studied experimental cholera bacteriophages resemble headphages from the genus *Vibrio*, but are unique, since they lie outside "cluster groups". *Vibrio* phages Rostov-1 and Rostov M3 are appeared to be lytic. Genes characteristic of moderate bacteriophages were found in cholera phages Rostov-6 and Rostov 7.

Conclusion. The experimental cholera bacteriophage Rostov-1 can be used to differentiate cholera vibriion O1 the serogroup of the El Tor biovar, and *Vibrio* phage Rostov M3 can be used to differentiate the Classical biovar. Both bacteriophages are lytic and promising components for creating prophylactic drugs against cholera. *Vibrio* phages Rostov-6 and Rostov 7 can be successfully used only in experimental activities, as well as for monitoring cholera vibriions in the environment. Complete genomic sequences are deposited and available in the international database Genbank (NCBI).

Keywords: cholera bacteriophages, *Vibrio* phage, biological properties, sequencing

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

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

For citation: Pogozhova M.P., Gayevskaya N.E., Vodopyanov A.S., Pisanov R.V., Anoprienko A.O., Romanova L.V., Tyurina A.V. Biological properties and genetic characteristics of experimental diagnostic *Vibrio cholerae* bacteriophages. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii.* 2021;98(3):290–297.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-39>

Введение

Холера представляет значительную угрозу для здравоохранения и выявляется не только в эндемичных регионах [1, 2]. Детальное изучение бактериофагов имеет как теоретическое, так и важное практическое значение. Бактериофаги используют для разработки эффективных методов фагодиагностики и фагопрофилактики возбудителей различных заболеваний, в том числе холеры. Вирулентные формы фагов являются одним из основных элементов биологической борьбы с бактериальной инфекцией [3, 4]. Только вирулентные бактериофаги могут применяться в составе профилактических препаратов, поскольку воздействие умеренных бактериофагов на культуру фагочувствительных бактериальных клеток приводит к образованию фагорезистентных вариантов. На сегодняшний день

обнаружено множество генов, характерных для умеренных бактериофагов, которые могут быть встроены в геном. Наиболее информативным методом для выявления генетических детерминант умеренных бактериофагов является полногеномное секвенирование [5, 6].

Цель исследования — изучение биологических свойств и генетических характеристик холерных бактериофагов Rostov-1, Rostov-6, Rostov 7 и Rostov M3, входящих в число экспериментальных диагностических бактериофагов *Vibrio cholerae* O1 серогруппы биоваров El Tor и Classical.

Материалы и методы

В исследование взяты бактериофаги Rostov-1, Rostov-6, Rostov 7 и Rostov M3, входящие в число экспериментальных диагностических бактериофа-

гов *V. cholerae* O1 серогруппы биоваров El Tor и Classical. Бактериофаги выделены из водных объектов окружающей среды и находятся в коллекции холерных фагов лаборатории бактериофагов Ростовского-на-Дону противочумного института.

Изучение биологических свойств проводили общепринятыми методами [7]. Для подготовки к электронно-микроскопическому исследованию препарат бактериофагов центрифугировали, отбирали супернатант и вносили в него полиэтиленгликоль 6000. Далее центрифугировали, удаляли супернатант, а осадок ресуспендировали деионизованной водой. Затем наносили препарат на сеточки для электронной микроскопии и контрастировали 2% водным раствором уранилацетата. После высушивания образцы просматривали в трансмиссионном электронном микроскопе «JEM-1011» («JEOL»). Электронограммы получены при помощи CDC-камеры «Olimpus-SIS-Veleta» («Olimpus») и программного обеспечения «iTEM-TEMImagingPlatform» («ResAlta»).

ДНК фагов выделяли в соответствии с ранее описанными методиками [8–10]. Количество и качество выделенной ДНК контролировали электрофорезом в 0,8% агарозном геле. Качество полученных препаратов фаговой ДНК исследовали, подвергая их гидролизу эндонуклеазами рестрикции, а также в ПЦР. Отсутствие бактериальных хромосом в пробах подтверждали методом ПЦР с использованием ген-специфичных праймеров для определения фрагментов ДНК *hly* и *ctx*⁺. Раствор фаговой ДНК хранили при –20°C.

Геномную последовательность бактериофагов определяли с использованием одного из методов высокопроизводительного секвенирования. ДНК фагов секвенирована с помощью полногеномного секвенатора «Miseq» («Illumina»).

Первичные данные секвенирования оценивали с использованием программы «FastQC» [11]. Для тримминга и коррекции ридов применяли алгоритмы Trimmomatic [12] и Lighter [13]. Сборку геномов, представленных в виде ридов, проводили в программе «Spades» [14]. Собранные геномы бактериофагов сравнивали с аннотированными последовательностями известных бактериофагов при помощи алгоритма BLASTN 2.2.29¹. Наличие или отсутствие генов, характерных для умеренных бактериофагов (генетических детерминант факторов резистентности, токсинов и интеграз), проверяли при помощи созданной нами базы данных и разработанного программного обеспечения «PhageAnalyzer»²,

¹ URL: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>

² Погожова М.П., Водопьянов А.С., Гаевская Н.Е. и др. PhageAnalyzer — программа для анализа данных полногеномного секвенирования бактериофагов. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2019616060 от 17.05.2019. Available at: <http://antiplague.ru/phageanalyzer/>

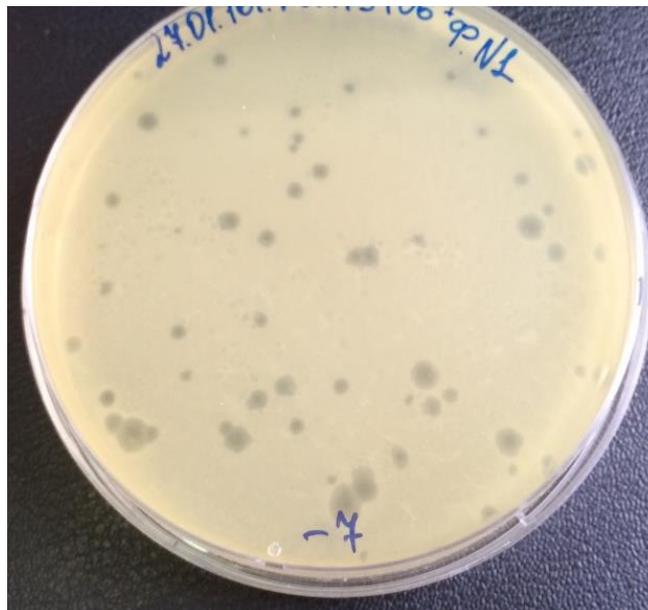


Рис. 1. Негативные колонии, образуемые на газоне индикаторной культуры *V. cholerae* O1 серогруппы биовара El Tor бактериофагом Rostov-1.

Fig. 1. Negative colonies formed on the lawn of the indicator culture of *V. cholerae* O1 serogroup of the El Tor biovar bacteriophage Rostov-1.

позволяющего проводить быстрый анализ данных полногеномного секвенирования бактериофагов и прогнозировать их жизненный цикл.

Результаты

Исследование методом электронной микроскопии показало, что экспериментальные бактериофаги — головчатые, но относятся к различным морфогруппам и семействам (табл. 1).

Холерные бактериофаги Rostov-1 и Rostov 7 активны в отношении *V. cholerae* серогруппы O1 биовара El Tor с диапазоном литической активности 57,5 и 66,3% соответственно. На газоне индикаторной культуры *Vibrio* фаг Rostov-1 образует колонии двух типов: мелкие (диаметром 1,0–1,5 мм) и крупные (3,0–6,0 мм) (рис. 1), а *Vibrio* фаг Rostov 7 образует прозрачные негативные колонии (1,0–1,5 мм).

Бактериофаг Rostov M3 активен в отношении холерного вибриона O1 серогруппы биовара Classical с диапазоном литической активности 83,3%. На газоне индикаторной культуры бактериофаг Rostov M3 образует прозрачные негативные колонии диаметром 1,5–2,0 мм. В свою очередь, *Vibrio* фаг Rostov-6 активен в отношении *V. cholerae* O1 серогруппы биоваров Classical и El Tor, в том числе к антибиотикоустойчивому штамму *V. cholerae* El Tor 19243 (стрептомицин, фуразолидон, триметоприм/сульфаметоксазол, налидиксовая кислота) со спектром литической активности 64,6%. На газоне индикаторной культуры *Vibrio* фаг Rostov-6 обра-

Таблица 1. Морфология исследованных фаговых корпускул
Table 1. Morphology of the studied phage corpuscles

Название бактериофага The name of bacteriophage	Размер и строение головки Head size and structure	Размер и строение хвоста Tail size and structure	Морфогруппа [15] Morphogroup [15]	Тип [16] Type [16]	Семейство Family
Rostov-1	440×515 Å Многогранная головка Multifaceted head	125 Å Короткий несократимый хвост Short irreducible tail	III	C	<i>Podoviridae</i>
Rostov-6	453×510 Å Многогранная головка Multifaceted head	110 Å Короткий несократимый хвост Short irreducible tail			
Rostov 7	453×510 Å Многогранная головка Multifaceted head	1023 Å Длинный сократимый хвост Long contractile tail	V	A	<i>Myoviridae</i>
Rostov M3	451×533 Å Многогранная головка Multifaceted head	113 Å Короткий сократимый хвост Short contractile tail			

Таблица 2. Анализ последовательностей геномов холерных экспериментальных бактериофагов
Table 2. Sequence analysis of the genomes of the experimental cholera bacteriophages

№ No.	Название фага Phage name	Размер генома п.н. Genome size, bp	Количество открытых рамок считывания Number of Open Reading Frame
1	Rostov-1	37 247	39
2	Rostov-6	39 934	15
3	Rostov 7	45 903	35
4	Rostov M3	46 669	50

зует прозрачные негативные колонии диаметром 1,0–1,5 мм.

Исследованные фаги устойчивы к воздействию хлороформа и инактивируются при 60°C в течение 30 мин. Специфичность экспериментальных бактериофагов в отношении хозяина подтверждена на большом наборе представителей близкородственных микроорганизмов семейств *Vibrionaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, которые не лизировались испытуемыми фагами.

Результаты, полученные при секвенировании геномов холерных экспериментальных бактериофагов, показали, что размеры их геномов колеблются от 37 до 47 тыс. пар нуклеотидов (табл. 2).

По данным биоинформационного анализа ДНК исследованных бактериофагов, в их составе выявлены гены, характерные для головчатых фагов *V. cholerae* (табл. 3).

Обсуждение

Морфологический анализ методом электронной микроскопии показал, что исследованные бактериофаги являются головчатыми. Эти данные подтверждает анализ нуклеотидных последова-

тельностей и относит экспериментальные диагностические холерные бактериофаги к ДНК-содержащим хвостатым фагам. Размеры геномов бактериофагов Rostov-1, Rostov-6, Rostov 7 и Rostov M3 достаточно большие, в них обнаружены гены, характерные для головчатых фагов рода *Vibrio* (табл. 3).

Бактериофаги Rostov-1 и Rostov 7 обладают способностью лизировать более широкий спектр штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы биовара El Tor по сравнению с другими холерными фагами El Tor. Фаг Rostov M3 активен в отношении *V. cholerae* O1 серогруппы биовара Classical с большим диапазоном литической активности. Холерный бактериофаг Rostov-6 также имеет высокий спектр литической активности и уникален тем, что активен в отношении *V. cholerae* O1 серогруппы биоваров как Classical, так и El Tor, в том числе антибиотикоустойчивого штамма *V. cholerae* El Tor 19243.

После сравнения генома бактериофага Rostov-1 с имеющимися в базе данных GenBank генами других фагов из группы *Vibrio phage* обнаружено, что только 23 открытых рамки считывания (ORF) имеют установленные функции. Гомологичные последова-

Таблица 3. Геномы головчатых фагов, представленные в базе данных GenBank (NCBI)**Table 3.** Genomes of head phages available in GenBank database (NCBI)

№ No.	Название фага Phage name	Номер доступа в GenBank GenBank accession number
1	<i>Vibrio</i> phage vB_VchM-138	JQ177064.1
2	<i>Vibrio</i> phage 24	KJ572844.2
3	<i>Vibrio</i> phage CP-T1	JQ177061.1
4	Phage CP-T1 (<i>Vibrio cholerae</i>)	X12375.1
5	<i>Vibrio</i> phage X29	KJ572845.2
6	<i>Vibrio</i> phage phi 2	KJ545483.2
7	<i>Vibrio</i> phage N4	FJ409640.1
8	<i>Vibrio</i> phage ICP3_2007_A	HQ641344.1
9	<i>Vibrio</i> phage ICP3	HQ641340.1
10	<i>Vibrio</i> phage ICP3_2008_A	HQ641343.1
11	<i>Vibrio</i> phage ICP3_2009_B	HQ641341.1
12	<i>Vibrio</i> phage JSF25	MF574151.1
13	<i>Vibrio</i> phage VP4	DQ029335.1
14	<i>Vibrio</i> phage VP3	JQ780163.1
15	<i>Vibrio</i> phage H2	KM612262.1
16	<i>Vibrio</i> phage CJY	KM612260.1
17	<i>Vibrio</i> phage J3	KM612265.1
18	<i>Vibrio</i> phage H3	KM612263.1
19	<i>Vibrio</i> phage H1	KM612261.1
20	<i>Vibrio</i> phage J2	KM612264.1
21	<i>Vibrio</i> phage phiVC8	JF712866.1
22	<i>Vibrio</i> phage VP5	AY510084.1
23	<i>Vibrio</i> phage QH	KM612259.1

тельности в известных бактериальных геномах не обнаружены. Установлено, что вибриофаг Rostov-1 является литическим, т.к. в результате биоинформационного анализа не обнаружено генов, характерных для умеренных бактериофагов.

В геноме бактериофага Rostov-6 идентифицированы 13 последовательностей, гомологичных бактериальным, что составляет большую часть генома. Также обнаружены 2 ORF, которые гомологичны фаговым. Бактериофаг Rostov-6 считается умеренным, потому что в нём обнаружена интеграна (YP_009153053.1) с гомологией 96,6%.

Бактериофаг Rostov 7 имеет 28 ORF из рода *Vibrio* и 7 ORF из других родов с установленными функциями. Обнаружены гомологичные последовательности в известных бактериальных геномах — гипотетические белки гамма-протеобактерий и профаг *Bacillus subtilis*. Поскольку в геноме найдены 2 интегразы с гомологией 96,6% (YP_009043902.1) и 94% (YP_009043892.1), бактериофаг Rostov 7 яв-

ляется умеренным.

Анализ нуклеотидных последовательностей фага Rostov M3 показал, что в геноме 50 ORF, и все они принадлежат роду *Vibrio*. После анализа данных, предоставленных системой BLASTN, обнаружены 3 бактериофага, гомологичные Rostov M3, относящиеся к тому же семейству *Myoviridae* [16]. Из них 2 фага *Vibrio* vB_VchM-138 и *Vibrio* phage 24, идентичные Rostov M3 на 99,08 и 98,31% соответственно, являются литическими, организм-хозяин — *V. cholerae* O1 серогруппы биовара Classical. Данные фаги описаны как диагностические, а также перспективные для фаготерапии [5, 17]. Третий *Vibrio* фаг CP-T1 идентичен Rostov M3 на 98,31%, но является умеренным и способен размножаться на обоих биоварах *V. cholerae* O1 Classical и El Tor [18]. Генетические детерминанты факторов резистентности, токсинов и интеграз не обнаружены, значит он является литическим.

Анализируя дендрограмму (рис. 2), следует отметить общность сходства исследованных экспериментальных диагностических бактериофагов с головчатыми фагами *V. cholerae* и принадлежность к данному семейству, но обособленное положение «вне кластерных групп» указывает на их уникальность.

Исследованные фаги имеют высокий процент сходства с геномами бактериофагов, представленных в базе данных GenBank, — 83–99%, но все же являются уникальными. Аннотированные последовательности фагов зарегистрированы в международной базе GenBank (табл. 4).

Заключение

Морфологическая структура экспериментальных диагностических холерных фагов представлена головчатыми бактериофагами различных морфогрупп. Негативные колонии фагов различались по диаметру, форме и степени прозрачности.

В геномах бактериофагов Rostov-1, Rostov-6, Rostov 7 и Rostov M3 генетических детерминант факторов резистентности и токсинов не обнаружено. В результате филогенетического анализа стало известно, что имеют сходство исследованные холерные экспериментальные бактериофаги с голов-

Таблица 4. Зарегистрированные геномы исследованных бактериофагов**Table 4.** Deposited genomes of the studied bacteriophages

Название бактериофага Phage name	Номер доступа в GenBank GenBank accession number
Rostov-1	MG957431
Rostov-6	MN105773
Rostov 7	MK575466.1
Rostov M3	MN379460-MN379463

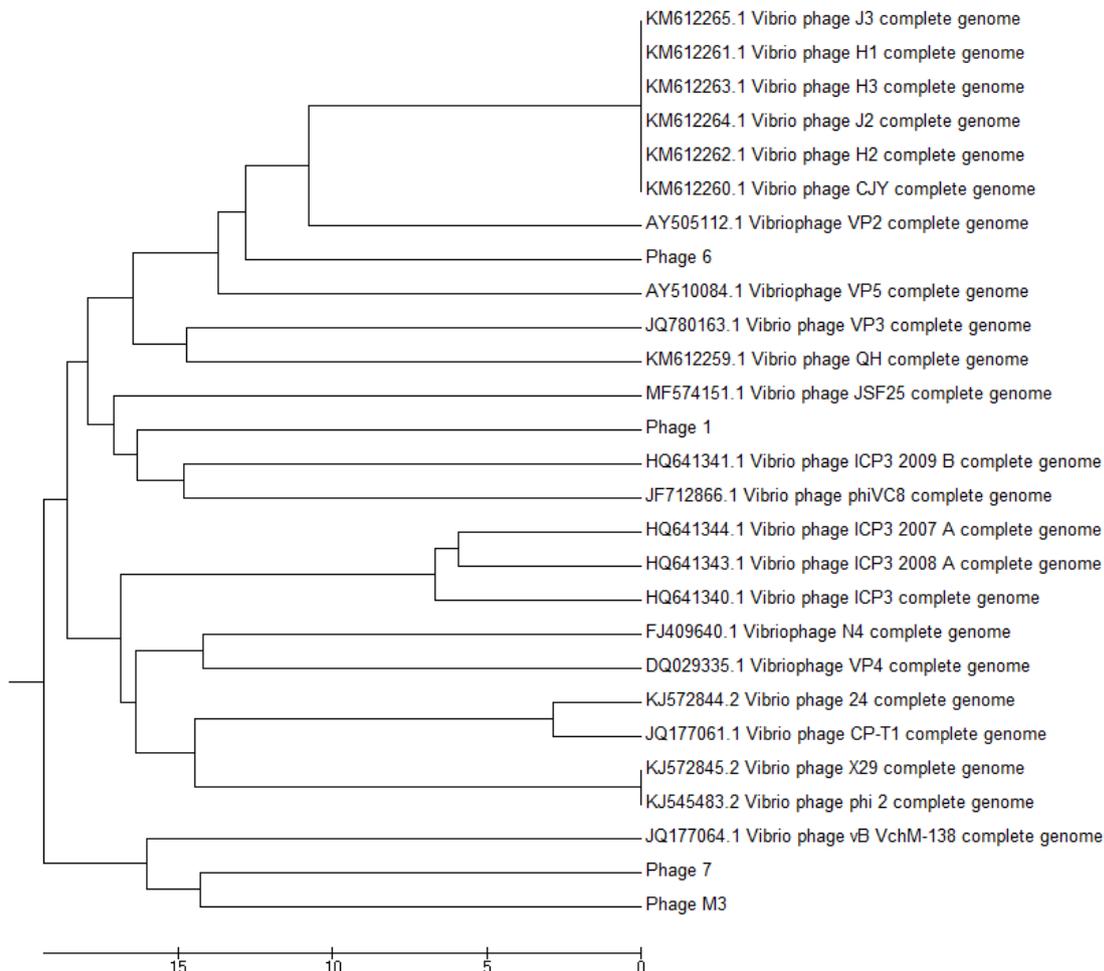


Рис. 2. Филогенетический анализ исследованных фаговых геномов.

Fig. 2. Phylogenetic analysis of genomes of the studied phages.

чатыми фагами из рода *Vibrio*, но являются уникальными, т.к. находятся «вне кластерных групп».

Экспериментальный холерный бактериофаг Rostov-1 может быть использован для дифференциации холерного вибриона O1 серогруппы биовара El Tor, а *Vibrio phage Rostov M3* — для биовара Classical. Выявлено, что оба бактериофага не содержат генетических детерминант, которые характерны для умеренных фагов. Холерные бактериофаги Rostov-1 и Rostov M3 являются литическими и перспективными компонентами для создания профилактических препаратов против холеры.

В структуре генома *Vibrio phage Rostov-6* и Rostov 7 найдены интегразы, поэтому использование фагов в профилактических препаратах исключено, т.к. они являются умеренными. Данные бактериофаги могут быть успешно использованы при мониторинге холерных вибрионов из окружающей среды, а также в экспериментальной деятельности.

Таким образом, была осуществлена биологическая и генетическая характеристика холерных бактериофагов Rostov-1, Rostov-6, Rostov 7 и Rostov M3.

Полные геномные последовательности зарегистрированы и доступны в международной базе GenBank.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. 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>
2. Centers for Disease Control and Prevention. 2010. Update: cholera outbreak – Haiti, 2010. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2010; 59(45): 1473–9.
3. Yen M., Cairns L.S., Camilli A. A cocktail of three virulent bacteriophages prevents *Vibrio cholerae* infection in animal models. *Nat. Commun.* 2017; 8: 14187. <https://doi.org/10.1038/ncomms14187>
4. D'Andrea M.M., Marmo P., Henrici De Angelis L., Palmieri M., Ciacci N., Di Lallo G., et al. ϕ BO1E, a newly discovered lytic bacteriophage targeting carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* of the pandemic Clonal Group 258 clade II lineage. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 2614. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02788-9>
5. Bhandare S.G., Warry A., Emes R.D., Hooton S.P.T., Barrow P.A., Atterbury R.J. Complete genome sequences of

- Vibrio cholerae*-specific Bacteriophages 24 and X29. *Genome Announc.* 2017; 5(46): e01013–17. <https://doi.org/10.1128/genomea.01013-17>
6. Comeau A.M., Tremblay D., Moineau S., Rattei T., Kushkina A.I., Tovkach F.I., et al. Phage morphology recapitulates phylogeny: the comparative genomics of a new group of myoviruses. *PLoS One.* 2012; 7(7): e40102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040102>
 7. Adams M.H. *Bacteriophages*. New York: Inter science Publishers; 1959.
 8. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д., ред. *Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование*. М.: Мир; 1984.
 9. Габрилович И.М. *Практическое пособие по бактериофагии*. Минск: Вышэйшая школа; 1968.
 10. Yamamoto K.R., Alberts B.M., Berzinger R., Lawhorne L., Treiber G. Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification. *Virology.* 1970; 40(3): 734–44. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(70\)90218-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(70)90218-7)
 11. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data 2010. Available at: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
 12. 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>
 13. Song L., Florea L., Langmead B. Lighter: fast and memory-efficient sequencing error correction without counting. *Genome Biol.* 2014; 15(11): 509. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0509-9>
 14. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012; 19(5): 455–77. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
 15. Тихоненко А.С. *Ультраструктура вирусов бактерий*. М.: 1968.
 16. Ackerman H.B. Bacteriophage taxonomy in 1987. *Microbiol. Sci.* 1987; 4(7): 214–8.
 17. Comeau A.M., Tremblay D., Moineau S., Rattei T., Kushkina A.I., Tovkach F.I., et al. Phage morphology recapitulates phylogeny: the comparative genomics of a new group of myoviruses. *PLoS One.* 2012; 7(7): e40102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040102>
 18. Guidolin A., Morelli G., Kamke M., Manning P.A. *Vibrio cholerae* bacteriophage CP-T1: characterization of bacteriophage DNA and restriction analysis. *J. Virol.* 1984; 51(1): 163–9. <https://doi.org/10.1128/jvi.51.1.163-169.1984>
 3. Yen M., Cairns L.S., Camilli A. A cocktail of three virulent bacteriophages prevents *Vibrio cholerae* infection in animal models. *Nat. Commun.* 2017; 8: 14187. <https://doi.org/10.1038/ncomms14187>
 4. D'Andrea M.M., Marmo P., Henrici De Angelis L., Palmieri M., Ciacci N., Di Lallo G., et al. ϕ BO1E, a newly discovered lytic bacteriophage targeting carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* of the pandemic Clonal Group 258 clade II lineage. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 2614. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02788-9>
 5. Bhandare S.G., Warry A., Emes R.D., Hooton S.P.T., Barrow P.A., Atterbury R.J. Complete genome sequences of *Vibrio cholerae*-specific Bacteriophages 24 and X29. *Genome Announc.* 2017; 5(46): e01013–17. <https://doi.org/10.1128/genomea.01013-17>
 6. Comeau A.M., Tremblay D., Moineau S., Rattei T., Kushkina A.I., Tovkach F.I., et al. Phage morphology recapitulates phylogeny: the comparative genomics of a new group of myoviruses. *PLoS One.* 2012; 7(7): e40102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040102>
 7. Adams M.H. *Bacteriophages*. New York: Inter science Publishers; 1959.
 8. Maniatis T., Fritsch E.E., Sambrook J. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor lab.; 1982.
 9. Габрилович И.М. *Практическое пособие по бактериофагии* [Практическое пособие по бактериофагии]. Минск: Высшейшая школа; 1968. (in Russian)
 10. Yamamoto K.R., Alberts B.M., Berzinger R., Lawhorne L., Treiber G. Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification. *Virology.* 1970; 40(3): 734–44. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(70\)90218-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(70)90218-7)
 11. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data 2010. Available at: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
 12. 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>
 13. Song L., Florea L., Langmead B. Lighter: fast and memory-efficient sequencing error correction without counting. *Genome Biol.* 2014; 15(11): 509. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0509-9>
 14. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012; 19(5): 455–77. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
 15. Tikhonenko A.S. *Ultrastructure of Bacteria Viruses* [Ultrastructure of Bacteria Viruses]. Moscow; 1968. (in Russian)
 16. Ackerman H.B. Bacteriophage taxonomy in 1987. *Microbiol. Sci.* 1987; 4(7): 214–8.
 17. Comeau A.M., Tremblay D., Moineau S., Rattei T., Kushkina A.I., Tovkach F.I., et al. Phage morphology recapitulates phylogeny: the comparative genomics of a new group of myoviruses. *PLoS One.* 2012; 7(7): e40102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040102>
 18. Guidolin A., Morelli G., Kamke M., Manning P.A. *Vibrio cholerae* bacteriophage CP-T1: characterization of bacteriophage DNA and restriction analysis. *J. Virol.* 1984; 51(1): 163–9. <https://doi.org/10.1128/jvi.51.1.163-169.1984>

REFERENCES

1. Moskvitina E.A., Tyuleneva E.G., Kruglikov V.D., Titova S.V., Vodoplyanov 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 osobopasnykh infektsiy.* 2018; (1): 36–43. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2018-1-36-43> (in Russian)
2. Centers for Disease Control and Prevention. 2010. Update: cholera outbreak – Haiti, 2010. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2010; 59(45): 1473–9.

Информация об авторах

Погожова Марина Павловна[✉] — м.н.с. лаб. бактериофагов Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия, m_pogozheva@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9779-3577>

Гаевская Наталья Евгеньевна — к.м.н., в.н.с., и.о. зав. лаб. бактериофагов Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0762-3628>

Водопьянов Алексей Сергеевич — к.м.н., и.о. зав. группой вирусологии Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>

Писанов Руслан Вячеславович — к.б.н., и.о. зав. лаб. диагностики особо опасных инфекций Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7178-8021>

Анопrienко Анна Олеговна — м.н.с. лаб. бактериофагов Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8466-9315>

Романова Людмила Васильевна — д.б.н., с.н.с. лаб. биохимии микробов Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5113-7387>

Тюрина Анна Владимировна — м.н.с. лаб. бактериофагов Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9359-3997>

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

Статья поступила в редакцию 15.05.2020;
принята к публикации 03.02.2021;
опубликована 20.06.2021

Information about the authors

Marina P. Pogozhova[✉] — junior researcher, Laboratory of bacteriophages, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, m_pogozheva@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9779-3577>

Natalya E. Gayevskaya — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Deputy head, Laboratory of bacteriophages, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, <https://orcid.org/0000-0002-0762-3628>

Alexey S. Vodopyanov — Cand. Sci. (Med.), Deputy head, Group of virology, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>

Ruslan V. Pisanov — Cand. Sci. (Biol.), Deputy head, Laboratory for diagnostics of especially dangerous infections, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, <https://orcid.org/0000-0002-7178-8021>

Anna O. Anoprienko — junior researcher, Laboratory of bacteriophages, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, <https://orcid.org/0000-0001-8466-9315>

Lyudmila V. Romanova — D. Sci. (Biol.), senior researcher, Microbial biochemistry laboratory, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, <https://orcid.org/0000-0002-5113-7387>

Anna V. Tyurina — junior researcher, Laboratory of bacteriophages, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, <https://orcid.org/0000-0002-9359-3997>

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.

The article was submitted 15.05.2020;
accepted for publication 03.02.2021;
published 20.06.2021

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-93>

Оценка действия азоксимера бромид (полиоксидония) на адгезивные свойства вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ по данным атомно-силовой микроскопии

Щуковская Т.Н.[✉], Гончарова А.Ю., Бугоркова С.А., Ерохин П.С., Кудрявцева О.М.

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия

Аннотация

Цель. Изучить характер действия азоксимера бромид (полиоксидония, ПО) в условиях культивирования на морфометрические показатели и адгезивность вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ и его изогенных производных *Y. pestis* KM218 (pYT⁻, pYV⁻, pYP⁻), *Y. pestis* KM216 (pYT⁻, pYV⁻, pYP⁺), *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* с применением атомно-силовой микроскопии (АСМ), а также на адгезию клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ к коллагену человека IV типа.

Материалы и методы. Измерения осуществляли с помощью сканирующего зондового микроскопа с использованием стандартных методов полуконтактной АСМ и программы анализа АСМ-изображений. Адгезию *Y. pestis* EV НИИЭГ к коллагену человека IV типа человека определяли по количеству клеток, прикрепившихся к стеклянным слайдам с коллагеном IV типа.

Результаты. Внесение ПО в среду культивирования вызывало достоверные изменения морфометрических параметров клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ и его изогенных производных (увеличение объема, коэффициента уплощённости, индекса *I*), указывающих на повышение пластичности и снижение ригидности клеточной стенки. Данные изменения сопровождались трансформацией наномеханических свойств клеточной поверхности (снижением среднеквадратической шероховатости, силы адгезии), выраженность которых связана с плазмидным профилем. В меньшей степени понижение силы адгезии при отсутствии достоверных изменений индекса *I* наблюдалось у клеток *Y. pseudotuberculosis* I и IV сероваров, а также у бактерий *Y. enterocolitica* 09 серовара с плазмидой pYV⁺. У штамма *Y. enterocolitica* KM383 (pYV⁻) ПО не индуцировал значимых изменений изучаемых показателей. Внесение ПО в среду культивирования приводило также к снижению способности клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ прикрепляться к коллагену человека IV типа. Модификация ПО адгезивных свойств вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ сопровождалась повышением его иммуногенности.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, азоксимера бромид, бактериальная клетка, атомно-силовая микроскопия, морфометрический анализ, поверхностная структура

Источник финансирования. Исследование выполнено при поддержке бюджетного финансирования в рамках темы НИР № АААА-А16-118011590103-А.

Для цитирования: Щуковская Т.Н., Гончарова А.Ю., Бугоркова С.А., Ерохин П.С., Кудрявцева О.М. Оценка действия азоксимера бромид (полиоксидония) на адгезивные свойства вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ по данным атомно-силовой микроскопии. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(3):298–307.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-93>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-93>

Evaluation of azoximer bromide (polyoxidonium) influence on the adhesive properties of the *Yersinia pestis* EV NIIEG vaccine strain by atomic force microscopy

Tatyana N. Shchukovskaya[✉], Anastasiya Y. Goncharova, Svetlana A. Bugorkova, Pavel S. Erokhin, Olga M. Kudryavtseva

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia

Abstract

Aim. To characterize the influence of azoximer bromide (polyoxidonium, PO) in cultivation conditions on the morpho- and nanomechanical cell surface properties of *Y. pestis* EV NIEG vaccine strain and its derivatives *Y. pestis* KM218 (pYT⁻, pYV⁻, pYP⁻), *Y. pestis* KM216 (pYT⁻, pYV⁻, pYP⁺), *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* by atomic force microscopy (AFM), as well as on the adhesion of cells *Y. pestis* EV NIEG to human collagen type IV.

Materials and methods. The measurements were carried out using the Solver P47-PRO probe microscope (NT-MDT, Russia), standard methods of semi-contact AFM and AFM imaging analysis program. The adhesion of *Y. pestis* EV NIEG to type IV collagen was determined by the number of cells binding to glass slides covered with human collagen type IV.

Results. The introduction of PO in the cultivation environment caused changes in the morphometric parameters of the cells of *Y. pestis* EV NIEG vaccine strain and its isogenic derivatives (increase in volume, flatten ingested (S/H), index *I* (W/H)). These changes were accompanied by the transformation of nanomechanical properties of the cell surface (reducing the root mean square, adhesion force), which countenance was associated with the plasmid profile. The lesser decrease of adhesion force in the absence of changes of the index *I* was observed in cells *Y. pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica* with plasmid pYV. In the strain *Y. enterocolitica* KM383 (pYV⁻) PO did not induce significant changes in the indicators studied. The introduction of the PO into the cultivation environment decreased the ability of *Y. pestis* EV cells to bind to human collagen type IV. Modification by PO the adhesive properties of the vaccine strain *Y. pestis* EV NIEG was accompanied by an increase in its immunogenicity.

Keywords: *Yersinia pestis*, azoximer bromide, bacterial cell, atomic force microscopy, morphometric analysis, surface structure

Funding source. The study was supported by budget funding within the framework of the research topic No. AAAA-A16-118011590103-A.

For citation: Shchukovskaya T.N., Goncharova A.Y., Bugorkova S.A., Erokhin P.S., Kudryavtseva O.M. Evaluation of azoximer bromide (polyoxidonium) influence on the adhesive properties of the *Yersinia pestis* EV NIEG vaccine strain by atomic force microscopy. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(3):298–307.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-49>

Введение

В развитии инфекционного процесса адгезия возбудителя к клеткам-мишеням, компонентам внеклеточного матрикса (ВКМ) играет ключевую роль, во многом определяя его начало, характер и течение [1–3]. Способность чумного микроба к адгезии обусловлена поверхностными структурами бактериальной клетки, которые могут быть представлены белками наружной мембраны — белком Ail, активатором плазминогена Pla, аутотранспортными белками различных классов YadB, YadC, Prp; специализированными органеллами — пиллями или фимбриями адгезии, образованными антигеном рН 6; наноразмерными везикулами внешней мембраны с включёнными белками Ail, Pla, капсульным антигеном F1 [4–6]. Наличие адгезинов способствует фиксации возбудителя чумы на поверхности эукариотических клеток, связыванию в различной степени с белками ВКМ ламинином, фибронектином, коллагеном IV типа, транслокации эффекторных белков в клетки-мишени, что обеспечивает уклонение от фагоцитоза и иммунологического распознавания организмом хозяина [1]. При снижении адгезивной активности штаммов чумного микроба разных подвидов зафиксировано повышение поглотительной способности фагоцитов у лабораторных животных [7].

В России синтезирован и внедрен в практику не имеющий аналогов за рубежом иммуноадьювант азоксимера бромид (полиоксидоний, ПО) — водорастворимое N-оксидированное производное полиэтиленпиперазина с молекулярной массой 80 кДа [8]. В условиях *in vivo* ПО обладает выражен-

ным иммуномодулирующим, детоксицирующим, антиоксидантным, мембраностабилизирующим и антигенусиливающим эффектом, применяется в схеме терапии ряда инфекционных заболеваний как вирусной, так и бактериальной этиологии, входит в состав вакцин против гриппа [9, 10].

Особенностью химической структуры ПО является наличие на поверхности его молекулы большого количества различных активных групп, которые могут взаимодействовать с белками поверхностных структур бактериальных клеток [8]. Имеется ряд сообщений об ингибирующем действии ПО на факторы персистенции патогенов. Установлено, что он изменяет адгезивные свойства патогенных и условно-патогенных бактерий и грибов (*Shigella flexneri*, *Salmonella enteritidis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*), снижает антилизоцимную и антикомплементарную активность микроорганизмов, повышает чувствительность ряда микроорганизмов к определенным антибиотикам групп линкозамидов, фторхинолонов, цефалоспоринов [11, 12].

Для изучения адгезивных свойств микроорганизмов на современном уровне применяются методы бионанотехнологии, оперирующей наноразмерными объектами, среди которых особое место занимает атомно-силовая микроскопия (АСМ). АСМ принадлежит к семейству проксимальной зондовой микроскопии для анализа поверхности и ее свойств на атомно-молекулярном уровне, позволяет проводить одновременное исследование с субнанометро-

вым пространственным разрешением локальных свойств клеточной стенки, в том числе жёсткости, пластичности и адгезивности [13, 14].

Сведения о непосредственном влиянии адьювантов с иммуномодулирующим действием на биологические свойства возбудителей особо опасных заболеваний бактериальной этиологии, архитектонику их поверхностных структур, в том числе клеток вакцинных штаммов, отсутствуют.

Цель исследования — изучение влияния азоксимера бромида на морфометрические характеристики и адгезивность вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ и других представителей рода *Yersinia* (*Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*) с применением АСМ, а также характера действия на адгезию клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ к белку ВКМ — коллагену IV типа.

Материалы и методы

В работе использованы полученные из Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб» вакцинный штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ (pYT⁺, pYV⁺, pYP⁺) и его изогенные производные *Y. pestis* KM218 (pYT⁻, pYV⁻, pYP⁻), *Y. pestis* KM216 (pYT⁻, pYV⁻, pYP⁺), штаммы *Y. pseudotuberculosis* I и IV сероваров, *Y. enterocolitica* KM33(201) (pYV⁺) 09 серовара, *Y. enterocolitica* KM383 (pYV⁻) 09 серовара. Штаммы микроорганизмов культивировали при 28°C и 37°C для *Y. enterocolitica* в течение 48 ч на питательной среде агар LB по Miller pH (7,2 ± 0,1) как с добавлением 60 мкг/мл иммуноадьюванта ПО (терапевтическая концентрация при разовом введении человеку), так и без внесения в среду ПО. Из выращенных культур готовили взвеси в стерильном 0,9% растворе NaCl pH 7,2 по стандартному образцу мутности ОСО 42-28-59-85П 10 единиц, эквивалентному 1 × 10⁹ микробных клеток на 1 мл, которые обеззараживали 2,5% раствором глутарового альдегида в 0,1 мольном какодилатном буфере pH (7,2–7,4) в течение 2 ч при 4°C с последующей проверкой на специфическую стерильность. Для проведения АСМ обеззараженные и дважды отмытые в стерильной дистиллированной воде бактериальные клетки помещали на поверхность подложки (стерильное предметное стекло) и высушивали на воздухе.

Исследования проводили с помощью сканирующего зондового микроскопа «Solver P47-PRO» («NT-MDT», Россия) в режиме прерывистого контакта АСМ следующими методами: полуконтактным, рассогласования и отображения фазы, а также в режиме непрерывного контакта следующими методами: постоянной силы и АСМ-спектроскопии. Использовали кремниевые зонды серии NSG01 («NT-MDT») жесткостью 5,1 Н/м с радиусом кривизны 10 нм и резонансной частотой 150 кГц и CSG30 («NT-MDT») жесткостью 0,1 Н/м с радиу-

сом кривизны 10 нм и резонансной частотой 48 кГц. Исследования проводили при оптимальных значениях основных параметров сканирования: амплитуда колебаний кантилевера Resonance 22 единицы, начальная фаза его колебаний Phase 240°, скорость сканирования Frequency 0,75 Гц, коэффициент усиления цепи обратной связи FB Gain 0,3 единицы, Set Point 19 единиц (величина Set Point и начальный уровень сигнала DFL определяли величину силы взаимодействия зонда с поверхностью образца).

Оценивали морфометрические показатели бактериальных клеток: длину (L), ширину (W), толщину (высоту, H), площадь поперечного сечения (S) и объем (V); коэффициент вытянутости клетки (L/W), характеризующий ее форму; коэффициент уплощенности (S/H), характеризующий степень пластичности клетки; индекс (I) отношения ширины клетки к ее высоте (W/H), характеризующий степень ригидности клеточной стенки; показатель среднеквадратичной шероховатости поверхности (root mean square — RMS), рассчитываемый как среднеквадратичная величина отклонений размеров пиков и впадин от средней линии поверхности подложки; силу адгезии. Обработку и анализ АСМ-изображений не менее чем 30 бактериальных клеток в каждом образце проводили с использованием программного обеспечения «Image Analysis» («NT-MDT»).

Изучение действия ПО на адгезию клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ к коллагену человека IV типа человека («Sigma-Aldrich», C7521) проводили по определению количества бактериальных клеток, прикрепившихся к стеклянным слайдам, предварительно обработанным раствором коллагена IV типа в фосфатно-солевом буфере pH 7,2 ± 0,1 концентрацией 20 мкг/мл [15]. Прикрепившиеся клетки фиксировали парами формальдегида, окрашивали кристаллвиолетом и подсчитывали с использованием микроскопа «Olimpus CX 31» с видеокамерой «JVC» в 20 полях зрения в 3 повторах при увеличении 900. Иммуногенность культур *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, выращенных на питательной среде агар LB по Miller pH 7,2 ± 0,1 с добавлением ПО и без, оценивали по уровню антигенов к капсульному антигену F1 чумного микроба в сыворотке крови мышей BALB/c на 21-е сутки после иммунизации подкожно дозой 2,5 × 10⁴ колониеобразующих единиц (КОЕ).

Протокол исследований одобрен Комиссией по биоэтике при ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 6 от 09.10.2019).

Определение антигенов проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с применением сертифицированной иммуноферментной тест-системы «ИФА-АТ-Ф1 YERSINIA PESTIS» рег. уд. № ФСР 2012/13946 — 101012 (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб») в строгом соответствии

с инструкцией по применению. Учет оптической плотности осуществляли на микропланшетном фотометре «Stat Fax-3200» при длине волны 405 нм. Наличие антител в сыворотке определяли в 3 повторях и выражали в виде обратного среднегеометрического титра и его среднего квадратического отклонения.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием стандартного пакета программ «Microsoft Office Excel 2016», «Statistica 10.0» («StatSoft Inc.»). Взаимосвязь между переменными определяли с помощью рангового корреляционного анализа по Спирмену. Достоверность различий сравниваемых величин оценивали с помощью парного *t*-критерия Стьюдента. Данные представляли в виде $M \pm m$, где M — среднее значение анализируемого показателя, m — средняя квадратическая ошибка средней арифметической. Значимость различий между группами оценивали с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Различия между группами наблюдения считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Выбор питательной среды агар LB по Miller pH $7,2 \pm 0,1$ в качестве среды культивирования для изучения действия ПО на морфометрические характеристики и адгезивность вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ и других представителей рода *Yersinia* обусловлен сравнительно близким по данным транскриптомного анализа характером роста чумного микроба в плазме крови человека [16], что позволяет более адекватно экстраполировать результаты исследований на процессы иммунопатогенеза в организме людей при чуме.

Полученные нами результаты экспериментальных исследований, представленные в табл. 1 и 2, свидетельствуют о непосредственном модифицирующем действии ПО на линейные параметры и адгезивные свойства бактериальных клеток вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ и других представителей рода *Yersinia*. На основании морфометрического анализа установлено достоверное увеличение объема клеток у штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ в 1,62 раза и его изогенных производных *Y. pestis* KM216 (pYT⁻, pYV⁻, pYP⁺), *Y. pestis* KM218 (pYT⁻,

Таблица 1. Морфометрические показатели клеток микроорганизмов рода *Yersinia* при культивировании на среде агар LB по Miller pH $7,2 \pm 0,1$ с добавлением ПО и без по данным АСМ ($M \pm m$)

Table 1. Morphometric cell counts of microorganisms of the genus *Yersinia* in cultivation conditions on the medium LB agar, Miller pH $7,2 \pm 0,1$ with the addition of PO and without it according to atomic-force microscopy ($M \pm m$)

Штаммы Strains	Среда Medium	Длина, мкм Length, μm	Ширина, мкм Width, μm	Высота, мкм Height, μm	Объем, мкм ³ Volume, μm^3
<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ (pYT ⁺ , pYV ⁺ , pYP ⁺) <i>Y. pestis</i> EV NIEEG	LB агар LB agar	$1,6 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$	$0,36 \pm 0,05$	$0,54 \pm 0,02$
	LB агар + ПО LB agar + PO	$2,4 \pm 0,1^*$	$1,1 \pm 0,1$	$0,32 \pm 0,05$	$0,88 \pm 0,02^*$
<i>Y. pestis</i> KM216 (pYT ⁻ , pYV ⁻ , pYP ⁺)	LB агар LB agar	$1,9 \pm 0,1$	$0,85 \pm 0,1$	$0,35 \pm 0,05$	$0,31 \pm 0,01$
	LB агар + ПО LB agar + PO	$2,1 \pm 0,1$	$0,85 \pm 0,1$	$0,29 \pm 0,05$	$0,54 \pm 0,02^*$
<i>Y. pestis</i> KM218 (pYT ⁻ , pYV ⁻ , pYP ⁻)	LB агар LB agar	$2,4 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$	$0,25 \pm 0,05$	$0,50 \pm 0,02$
	LB агар + ПО LB agar + PO	$2,5 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$	$0,25 \pm 0,05$	$0,59 \pm 0,02^*$
<i>Y. pseudotuberculosis</i> I серовар I serovar	LB агар LB agar	$1,5 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$0,35 \pm 0,05$	$0,38 \pm 0,02$
	LB агар + ПО LB agar + PO	$1,4 \pm 0,1$	$0,65 \pm 0,1$	$0,30 \pm 0,05$	$0,28 \pm 0,01^*$
<i>Y. pseudotuberculosis</i> IV серовар IV serovar	LB агар LB agar	$1,7 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$0,35 \pm 0,05$	$0,43 \pm 0,01$
	LB агар + ПО LB agar + PO	$1,9 \pm 0,1$	$0,65 \pm 0,05$	$0,30 \pm 0,05$	$0,39 \pm 0,02$
<i>Y. enterocolitica</i> KM33(201) (pYV ⁺) 09 серовар 09 serovar	LB агар LB agar	$1,4 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$	$0,25 \pm 0,05$	$0,22 \pm 0,01$
	LB агар + ПО LB agar + PO	$1,2 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$	$0,30 \pm 0,05$	$0,23 \pm 0,01$
<i>Y. enterocolitica</i> KM383(pYV ⁻) 09 серовар 09 serovar	LB агар LB agar	$1,4 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$	$0,35 \pm 0,05$	$0,26 \pm 0,01$
	LB агар + ПО LB agar + PO	$1,4 \pm 0,1$	$0,55 \pm 0,1$	$0,30 \pm 0,05$	$0,24 \pm 0,01$

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с параметрами при культивировании на LB агаре.

Note. * $p < 0,05$ in comparison with parameters when cultivating on LB agar.

Таблица 2. Морфо- и наномеханические показатели клеток микроорганизмов рода *Yersinia* при выращивании на среде агар LB по Miller pH 7,2 ± 0,1 с ПО и без по данным АСМ ($M \pm m$)**Table 2.** Morpho- and nanomechanical cell surface properties of microorganisms of the genus *Yersinia* in cultivation conditions on the medium LB agar, Miller pH 7,2 ± 0,1 with PO and without it according to atomic-force microscopy ($M \pm m$)

Штаммы Strains	Среда Medium	Индекс <i>I</i> Index <i>I</i>	<i>S/H</i>	RMS	Сила адгезии, нН Adhesion force, nN
<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ (pYT ⁺ , pYV ⁺ , pYP ⁺) <i>Y. pestis</i> EV NIIEG	LB агар LB agar	2,5 ± 0,1	0,70 ± 0,02	33 ± 1	6,6 ± 0,1
	LB агар + ПО LB agar + PO	3,5 ± 0,1*	0,88 ± 0,03*	25 ± 1*	4,9 ± 0,1*
<i>Y. pestis</i> KM216 (pYT ⁻ , pYV ⁻ , pYP ⁺)	LB агар LB agar	2,4 ± 0,1	0,6 ± 0,02	37 ± 1	6,5 ± 0,1
	LB агар + ПО LB agar + PO	2,9 ± 0,1*	0,67 ± 0,02*	27 ± 1*	5,0 ± 0,1*
<i>Y. pestis</i> KM218 (pYT ⁻ , pYV ⁻ , pYP ⁻)	LB агар LB agar	3,2 ± 0,1	0,64 ± 0,02	30 ± 1	4,7 ± 0,1
	LB агар + ПО LB agar + PO	3,6 ± 0,1*	0,72 ± 0,02*	27 ± 1	4,2 ± 0,1*
<i>Y. pseudotuberculosis</i> I серовар I serovar	LB агар LB agar	2,0 ± 0,1	0,54 ± 0,02	35 ± 2	2,3 ± 0,1
	LB агар + ПО LB agar + PO	2,16 ± 0,10	0,50 ± 0,02	26 ± 1*	1,9 ± 0,1*
<i>Y. pseudotuberculosis</i> IV серовар IV serovar	LB агар LB agar	2,0 ± 0,1	0,54 ± 0,02	36 ± 2	2,7 ± 0,1
	LB агар + ПО LB agar + PO	2,16 ± 0,1	0,51 ± 0,02	27 ± 1*	2,1 ± 0,1*
<i>Y. enterocolitica</i> KM33(201) (pYV ⁺) 09 серовар 09 serovar	LB агар LB agar	2,4 ± 0,1*	0,48 ± 0,02	38 ± 2	3,5 ± 0,1
	LB агар + ПО LB agar + PO	2,0 ± 0,1	0,47 ± 0,02	35 ± 1	2,7 ± 0,1*
<i>Y. enterocolitica</i> KM383(pYV ⁻) 09 серовар 09 serovar	LB агар LB agar	1,7 ± 0,1	0,48 ± 0,02	37 ± 2	2,3 ± 0,1
	LB агар + ПО LB agar + PO	1,8 ± 0,1	0,44 ± 0,02	33 ± 1	2,2 ± 0,1

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с параметрами при культивировании на LB агаре.**Note.** Index *I* — wight/length; *S/H* — square/height; *RMS* — root mean square. * $p < 0,05$ in comparison with parameters when cultivating on LB agar.

pYV⁻, pYP⁻) — в 1,7 и 1,18 раза соответственно ($p < 0,05$) при культивировании на среде с ПО. Коэффициент уплощённости, характеризующий степень пластичности бактериальной клетки [17], также достоверно ($p < 0,05$) увеличивался в 1,26 раза у клеток вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, в 1,1 и 1,12 раза — у штаммов *Y. pestis* KM216, *Y. pestis* KM218 соответственно.

По данным АСМ зарегистрировано значимое ($p < 0,05$) влияние ПО на повышение индекса *I*, уменьшение в нанометровом диапазоне среднеквадратической шероховатости клеточной поверхности и силы адгезии у клеток вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ и его изогенных производных с различным плазмидным составом.

Полученные нами результаты морфометрического анализа свидетельствуют, что введение ПО в состав среды культивирования приводит к увеличению пластичности и снижению ригидности клеточной стенки, среднеквадратической шероховатости клеточной поверхности, силы адгезии чумного микроба, наиболее выраженным у штамма *Y. pestis*

EV НИИЭГ. Корреляционный анализ показал прямую зависимость увеличения коэффициента уплощённости, индекса *I* ($r_s = 0,954-0,979$ при значении критерия Стьюдента $t = 1,61-3,44$) и обратную зависимость — для среднеквадратической шероховатости клеточной поверхности и силы адгезии ($r_s = -(0,967-0,984)$ при значении критерия Стьюдента $t = 1,93-3,52$), что свидетельствовало о функциональной связи выявленных изменений морфометрических показателей с присутствием ПО в среде культивирования. В меньшей степени снижение силы адгезии при отсутствии достоверных изменений индекса *I* под действием ПО наблюдалось у клеток *Y. pseudotuberculosis* I и IV сероваров, а также у бактерий *Y. enterocolitica* 09 серовара с плазмидой pYV⁺. У штамма *Y. enterocolitica* KM 383 (pYV⁻) 09 серовара при культивировании на среде с ПО не выявлено значимых изменений морфометрических показателей бактериальных клеток и наномеханических свойств их поверхности.

Параллельно с определением характера действия ПО на морфометрические характеристики

и адгезивность вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ с применением АСМ нами изучено влияние данного иммуноадьюванта на адгезию клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ к белку ВКМ — коллагену человека IV типа. Коллаген IV типа является ключевым структурным компонентом базальных мембран сосудистого эндотелия и слизистых оболочек. Молекула коллагена IV типа служит лигандом для интегринов, рецепторов на поверхности клеток, обеспечивая клеточную адгезию, миграцию и дифференцировку [18, 19]. Установлено, что введение ПО в состав среды культивирования приводит к достоверному ($p < 0,05$) уменьшению количества клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ, прикрепившихся к коллагену человека IV типа по сравнению с культивированием на среде без ПО — $68 \pm 4,75$ и $96 \pm 10,5$ микробных клеток соответственно. В то же время мало выраженная по силе отрицательная корреляция ($r_s = -0,4755$; $p = 0,04$) свидетельствует о второстепенном значении компонента ВКМ коллагена IV типа в качестве мишени в механизме действия ПО на адгезивность клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ.

Модификация ПО адгезивных свойств вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ сопровождалась изменением его иммуногенности в сторону повышения. Характеристики антигенной активности культур *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенных на питательной среде агар LB по Miller pH $7,2 \pm 0,1$ с добавлением ПО и без него, представлены в табл. 3.

Установлено, что уровень антител к капсульному антигену чумного микроба F1 в 1,7 раза выше в группе животных, иммунизированных вакцинным штаммом *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенным на питательной среде с ПО.

Обсуждение

Известно, что адгезины патогенных иерсиний действуют на разных стадиях инфекционного процесса, выполняют множественные функции,

не только участвуют в процессах прикрепления к клеткам хозяина, но и связаны с проявлением таких свойств, как инвазия, персистенция, выживание в клетках хозяина, биопленкообразование, цитотоксичность [20]. Адгезия бактериальных клеток к контактирующим поверхностям может реализовываться за счет формирования нескольких типов связей, различных по природе и специфичности. К ним относятся неспецифические физико-химические связи, такие как силы Ван-дер-Ваальса, электростатические, гидрофобные, стерические, водородные связи, а также специфические лиганд-рецепторные взаимодействия между поверхностными структурами бактерий (адгезинами) и рецепторами клеток-мишеней организма хозяина [21, 22]. АСМ позволяет получить 3D-изображения единичных бактериальных клеток и их поверхностных ультраструктур, проводить точную морфометрическую оценку их основных параметров, исследовать молекулярные (гидрофобные и электростатические) взаимодействия на поверхности бактерий, картировать физико-химические свойства, измерять ригидность клеточной стенки и адгезивные свойства клеточной поверхности [23, 24]. Результаты нашего исследования показали, что введение ПО в состав среды культивирования приводило к достоверным изменениям индикаторных морфометрических параметров клеток вакцинного штамма чумного микроба *Y. pestis* EV линии НИИЭГ (увеличению объема, коэффициента уплощенности, индекса λ), указывающих на повышение пластичности и снижение ригидности клеточной стенки. Выявленные изменения морфометрических показателей сопровождалось трансформацией наномеханических свойств клеточной поверхности (снижением среднеквадратической шероховатости, силы адгезии) бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ, что свидетельствует о присутствии молекулярных мишеней для ПО на наружной мембране чумного микроба.

Таблица 3. Титры антител к капсульному антигену F1 чумного микроба в сыворотке крови мышей BALB/c, вакцинированных *Y. pestis* EV НИИЭГ в условиях культивирования на среде агар LB по Miller pH $7,2 \pm 0,1$ с добавлением ПО и без ($M \pm m$)

Table 3. Antibody titers to *Y. pestis* F1 capsule antigen in serum BALB/c mice vaccinated with *Y. pestis* EV NIIEG cultivated on LB agar, Miller pH $7,2 \pm 0,1$ with the addition of PO and without it ($M \pm m$)

Иммунизирующий штамм, доза (КОЕ) Strain used for immunization, dose (CFU)	Количество животных Number of animals	Реципрокные значения среднегеометрического титра Geometric mean reciprocal titers
<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ (LB агар, Miller pH 7,2) <i>Y. pestis</i> EV NIIEG (LB agar, Miller pH 7,2) $2,5 \times 10^4$	10	$76 \pm 35,43$
<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ (LB агар, Miller pH 7,2 + ПО) <i>Y. pestis</i> EV NIIEG (LB agar, Miller pH 7,2 + PO) $2,5 \times 10^4$	10	$136 \pm 36,6^*$
0,9% NaCl	10	< 40

Примечание. * $p < 0,05$ по отношению к группе сравнения, иммунизированных *Y. pestis* EV НИИЭГ.
Note. $p < 0.05$ in comparison with mice immunized with *Y. pestis* EV NIIEG.

Биологические функции напрямую связаны с составом и организацией микробной поверхности. Ряд идентифицированных белков наружной мембраны патогенных иерсиний, функции которых определяют адгезию микробных клеток к структурным компонентам хозяина, относятся к аутотранспортным белкам или системе секреции V типа. Патогенные виды рода *Yersinia* экспрессируют аутотранспортные белки типов Va, Vc и Ve [4]. YadA — многофункциональный белок наружной мембраны *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*, относящийся к адгезинам типа Vc и кодируемый плазмидой вирулентности pYV (pCad). Помимо осуществления основной функции — адгезии бактерий, YadA участвует в процессах аутоагглютинации, инвазии, устойчивости к фагоцитозу, бактерицидному действию сыворотки. Интенсивность биосинтеза YadA возрастает при 37°C, обеспечивая покрытие этим белком значительной части поверхности микробной клетки [20]. Как показали результаты настоящего исследования, ПО, по-видимому, может оказывать ингибирующее действие на продукцию белка YadA, на что указывают значимое снижение силы адгезии у бактериальных клеток штамма *Y. enterocolitica* KM-33(201) 09 серовара с плазмидой pYV (pCad⁺) при отсутствии таковых у *Y. enterocolitica* KM 383 (pYV⁻) 09 серовара в одинаковых условиях культивирования на среде с ПО при 37°C.

Одним из факторов адгезии возбудителя чумы является активатор плазминогена Pla, принадлежащий к семейству сериновых протеаз наружных мембран энтеробактерий и кодируемый видоспецифичной плазмидой pYP (pPla, pPCP1 или pPst). Четвертичная структура белка представлена 5 периплазматическими и 5 внеклеточными петлями, выступающими в межклеточное пространство на расстоянии около 40 Å от липидного бислоя наружной мембраны. Белок Pla *Y. pestis*, помимо активации плазминогена и превращения его в плазмин путем ограниченного протеолиза, способен к гидролизу С3 компонента комплемента, протеолитическому инаktivированию антимикробного пептида — кателицидина LL-37, а также TNF- α , IFN- γ , IL-8 и протеина 1 хемотаксиса моноцитов [25, 26]. Сравнительный анализ полученных нами данных АСМ штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ и его изогенных производных показал, что у безплазмидного штамма *Y. pestis* KM218 (pYT⁻, pYV⁻, pYP⁻) значение силы адгезии достоверно ($p < 0,05$) меньше таковых, измеренных для клеток штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ (pYT⁺, pYP⁺, pYV⁺) и штамма *Y. pestis* KM216, имеющего только одну плазмиду pYP. Введение ПО в состав среды культивирования приводило к значимому снижению показателя среднеквадратичной шероховатости поверхности и силы адгезии у клеток вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ и

его изогенных производных, выраженность проявлений которых зависела от плазмидного профиля. У штамма *Y. pestis* KM218, утратившего плазмиды pYP, pYV и pYT, зарегистрированы наиболее низкие исходные показатели адгезивных свойств клеточной поверхности бактерий и наименее значимые их изменения под действием ПО.

Активатор плазминогена Pla также может избирательно связываться с белками ВКМ и базальными мембранами (ламинином, коллагеном IV типа), обеспечивая тем самым уклонение от захвата профессиональными фагоцитами хозяина в мало доступных лейкоцитам местах [25, 27]. Нами установлено, что введение ПО в состав среды культивирования приводило к снижению способности клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ прикрепляться к коллагену человека IV типа — ключевому структурному компоненту базальных мембран сосудистого эндотелия и слизистых оболочек.

Как известно, липополисахарид (ЛПС) представляет собой сигнальную молекулу, распознаваемую системой врожденного иммунитета и обеспечивающую её активацию на самых ранних стадиях вакцинального процесса. Антигенпрезентирующие клетки (дендритные, клетки Лангерганса) организма хозяина экспрессируют на своей поверхности лектиновые рецепторы DC-SIGN (DC-specific intercellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin receptor) или CD209 и лангерин (CD207), которые могут связываться непосредственно с коровой областью ЛПС *Y. pestis* [28]. CD209 представлен также на поверхности макрофагов, включая альвеолярные макрофаги человека [29]. С помощью атомно-силовой спектроскопии с использованием оптической ловушки показано непосредственное участие в связывании с мембраной макрофага коровой области ЛПС *Y. pestis* вакцинного штамма EV НИИЭГ [30]. Установлено, что при 28°C синтезируется гекса-ацилированная форма липида А ЛПС *Y. pestis* со стимулирующей паттернраспознающей TLR4/MD2-рецептор активностью, имеющей важное значение в инициации формирования антибактериального адаптивного иммунитета [31, 32]. По данным S. Montminy и соавт. [33], мутант вирулентного штамма *Y. pestis* KIM1001-pLpxL с конститутивным синтезом гексагональной формы липида А утрачивал вирулентность для биопробных животных при наличии всех известных детерминант вирулентности и индуцировал формирование защиты в эксперименте от бубонной и легочной форм чумы. В нашей работе зарегистрировано повышение иммуногенных свойств культур вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенных на питательной среде с добавлением ПО при 28°C. По-видимому, особенность химической структуры ПО (сополимер N-окси-1,4-этиленпиперазина и (N-карбокси)-1,4-этиленпиперазиния бромида), связанной с на-

личиём N-оксидных и карбоксильных групп, может способствовать изменению экспрессии адгезинов на клеточной поверхности и повышению функциональной активности гекса-ацилированного ЛПС за счет уменьшения его экранирования и изменения пространственной ориентации. Также результаты настоящего исследования свидетельствуют о возможной связи направленности трансформирующего действия ПО наномеханических свойств клеточной поверхности (среднеквадратической шероховатости, силы адгезии) со снижением биосинтеза адгезинов, кодируемых плазмидой рУР у вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ и плазмидой рYV у штаммов других представителей рода *Yersinia* (*Y. pseudotuberculosis* I и IV сероваров, *Y. enterocolitica* 09 серовара). Вопрос о молекулярных механизмах этого воздействия и связи с защитной эффективностью вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ от чумной инфекции является предметом дальнейших исследований.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Ribet D., Cossart P. How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. *Microbes Infect.* 2015; 17(3): 173–83. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.01.004>
- Tsang T.M., Annis D.S., Kronshage M., Fenno J.T., Usselman L.D., Mosher D.F., et al. Ail protein binds ninth type III fibronectin repeat (9FNIII) within central 120-kDa region of fibronectin to facilitate cell binding by *Yersinia pestis*. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(20): 16759–67. <https://doi.org/10.1074/jbc.m112.358978>
- Vaca D.J., Thibau A., Schütz M., Kraiczky P., Happonen L., Malmström J., et al. Interaction with the host: the role of fibronectin and extracellular matrix proteins in the adhesion of Gram-negative bacteria. *Med. Microbiol. Immunol.* 2020; 209(3): 277–99. <https://doi.org/10.1007/s00430-019-00644-3>
- Куклева Л.М. Адгезины возбудителя чумы. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2018; (2): 14–22. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2018-2-14-22>
- Eddy J.L., Gielda L.M., Caulfield A.J., Rangel S.M., Latham W.W. Production of outer membrane vesicles by the plague pathogen *Yersinia pestis*. *PLoS One.* 2014; 9(9): e107002. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107002>
- Qing G., Gong N., Chen X., Chen J., Zhang H., Wang Y., et al. Natural and engineered bacterial outer membrane vesicles. *Biophys. Rep.* 2019; 5(4): 184–98. <https://doi.org/10.1007/s41048-019-00095-6>
- Дубровина В.И., Мухтургин Г.Б., Балахонов С.В., Витязева С.А., Старовойтова Т.П., Иванова Т.А. и др. Изучение иммунофизиологических свойств штаммов чумного микроба с различным плазмидным составом. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук.* 2013; (6): 136–9.
- Петров Р.В., Хайтов Р.М., Некрасов А.В., Аттаулаханов Р.И., Пучкова Н.Г., Иванова А.С. и др. Полиоксидоний: Механизм действия и клиническое применение. *Медицинская иммунология.* 2000; 2(3): 271–8.
- Омельченко Н.Д., Иванова И.А., Беспалова И.А., Филиппенко А.В. Иммуномодуляторы и специфическая профилактика инфекционных болезней. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2017; (3): 21–6. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-3-21-2>
- Shakya A.K., Nandakumar K.S. Applications of polymeric adjuvants in studying autoimmune responses and vaccination against infectious diseases. *J. R. Soc. Interface.* 2013; 10(79): 20120536. <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0536>
- Крылов Д.А., Чайникова И.Н., Перунова Н.Б., Челпаченко О.Е., Паньков А.С., Смолягин А.И. и др. Влияние иммуномодулятора полиоксидония на биологические свойства микроорганизмов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2003; (4): 74–8.
- Харсеева Г.Г., Москаленко Е.П., Алутина Э.Л., Бредао А.М. Влияние полиоксидония на адгезивные свойства *Corynebacterium diphtheriae*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2009; (2): 11–5.
- Сафенкова И.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Применение атомно-силовой микроскопии для характеристики единичных межмолекулярных взаимодействий. *Успехи биологической химии.* 2012; 52: 281–314.
- Beaussarta A., El-Kirat-Chatel S. Microbial adhesion and ultrastructure from the single-molecule to the single-cell levels by Atomic Force Microscopy. *Cell Surf.* 2019; 5: 10003. <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2019.100031>
- Yamashita S., Lukacik P., Barnard T.J., Noinaj N., Felek S., Tsang T.M., et al. Structural insights into Ail-mediated adhesion in *Yersinia pestis*. *Structure.* 2011; 19(11): 1672–82. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.08.010>
- Chauvaux S., Dillies M.A., Marceau M., Rosso M.L., Rousseau S., Moszer I., et al. *In silico* comparison of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* transcriptomes reveals a higher expression level of crucial virulence determinants in the plague bacillus. *Int. J. Med. Microbiol.* 2011; 301(2): 105–16. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.08.013>
- Уткин Д.В., Булгакова Е.Г., Ерохин П.С., Кузнецов О.С., Куклев В.Е., Осина Н.А. Исследование морфологических особенностей клеток бактерий *Yersinia pestis*, выращенных при различных температурных условиях, методом атомно-силовой микроскопии. *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология.* 2019; 19(1): 87–93. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2019-19-1-87-93>
- Arseni L., Lombardi A., Orioli D. From structure to phenotype: impact of collagen alterations on human health. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19(5): 1407. <https://doi.org/10.3390/ijms19051407>
- Karsdal M.A., ed. *Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin.* Oxford: Academic Press; 2019. <https://doi.org/10.1016/C2018-0-00074-2>
- Бывалов А.А., Конышев И.В. Адгезины *Yersinia pseudotuberculosis*. *Инфекция и иммунитет.* 2019; 9(3–4): 437–48. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2019-3-4-437-448>
- Ma C.D., Acevedo-Vélez C., Wang C., Gellman S.H., Abbott N.L. Interaction of the hydrophobic tip of an atomic force microscope with oligopeptides immobilized using short and long tethers. *Langmuir.* 2016; 32(12): 2985–95. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b04618>
- Iqbal K.M., Bertino M.F., Shah M.R., Ehrhardt C.J., Yadavalli V.K. Nanoscale phenotypic textures of *Yersinia pestis* across environmentally-relevant matrices. *Microorganisms.* 2020; 8(2): 160. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020160>
- Плескова С.Н., Дубровин Е.В., Голубева И.С., Горшкова Е.Н., Пудовкина Е.Е. Нанотехнологическая АСМ-морфометрия бактериальных клеток. *Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского.* 2013; (2-2): 34–8.
- Yuan Y., Hays M.P., Hardwidge P.R., Kim J. Surface characteristics influencing bacterial adhesion to polymeric substrates. *RSC Advances.* 2017; 7: 14254–61. <https://doi.org/10.1039/c7ra01571b>
- Евсеева В.В., Платонов М.Е., Копылов П.Х., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Активатор плазминогена чумного микроба. *Инфекция и иммунитет.* 2015; 5(1): 27–36. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2015-1-27-36>

26. Куклева Л.М., Бойко А.В. Активатор плазминогена – многофункциональный белок возбудителя чумы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; (3): 13–20. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-3-13-20>
27. Kienle Z., Emody L., Svanborg C., O'Tool P.W. Adhesive properties conferred by the plasminogen activator of *Yersinia pestis*. *J. Gen. Microbiol.* 1992; 138(Pt. 8): 1679–87.
28. Zhang P., Skurnik M., Zhang S., Schwartz O., Kalyanasundaram R., Bulgheresi S., et al. Human dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin (CD209) is a receptor for *Yersinia pestis* that promotes phagocytosis by dendritic cells. *Infect. Immun.* 2008; 76(5): 2070–9. <https://doi.org/10.1128/IAI.01246-07>
29. Yang K., He Y., Park C.G., Kang Y.S., Zhang P., Han Y., et al. *Yersinia pestis* interacts with SIGNR1 (CD209b) for promoting host dissemination and infection. *Front. Immunol.* 2019; 10: 96. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00096>
30. Byvalov A.A., Kononenko V.L., Konyshev I.V. Single-cell force spectroscopy of interaction of lipopolysaccharides from *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* with J774 macrophage membrane using optical tweezers. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A*. 2018; 12: 93–106. <https://doi.org/10.1134/S1990747818020058>
31. Книрель Ю.А., Анисимов А.П. Липополисахарид чумного микроба *Yersinia pestis*: структура, генетика, биологические свойства. *Acta Naturae*. 2012; 4(3): 49–61. <https://doi.org/10.32607/20758251-2012-4-3-46-58>
32. Wang C., Stanciu C.E., Ehrhardt C.J., Yadavalli V.K. The effect of growth temperature on the nanoscale biochemical surface properties of *Yersinia pestis*. *Anal. Bioanal. Chem.* 2016; 408(40): 5585–91. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9659-9>
33. Montminy S., Khan N., McGrath S., Walkowicz M. J., Sharp F., Conlon J.E., et al. Virulence factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response. *J. Nature Immun.* 2006; 7(10): 1066–73. <https://doi.org/10.1038/ni1386>
8. Petrov R.V., Khaitov R.M., Nekrasov A.V., Attalukhanov R.I., Puchkova N.G., Ivanova A.S. et al. Polyoxodionium – mechanisms of action and clinical relevance. *Meditinskaya immunologiya*. 2000; 2(3): 271–8. (in Russian)
9. Omel'chenko N.D., Ivanova I.A., Bessalova I.A., Filippenko A.V. Immunomodulators and specific prophylaxis of infectious diseases. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2017; (3): 21–6. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-3-21-2> (in Russian)
10. Shakya A.K., Nandakumar K.S. Applications of polymeric adjuvants in studying autoimmune responses and vaccination against infectious diseases. *J. R. Soc. Interface*. 2013; 10(79): 20120536. <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0536>
11. Krylov D.A., Chaynikova I.N., Perunova N.B., Chelpachenko O.E., Pan'kov A.S., Smolyagin A.I., et al. Effect of a Polyoxodionium immunoregulator on the biological properties of microorganisms. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2003; (4): 74–8. (in Russian)
12. Kharseeva G.G., Moskalenko E.P., Alutina E.L., Breda A.M. Influence of Polyoxodionium on adhesive properties of *Corynebacterium diphtheriae*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2009; (2): 11–5. (in Russian)
13. Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Application of atomic force microscopy for characteristics of single intermolecular interactions. *Uspekhi biologicheskoy khimii*. 2012; 52: 281–314. (in Russian)
14. Beaussarta A., El-Kirat-Chatel S. Microbial adhesion and ultrastructure from the single-molecule to the single-cell levels by Atomic Force Microscopy. *Cell Surf.* 2019; 5: 10003. <https://doi.org/10.1016/j.tcsu.2019.100031>
15. Yamashita S., Lukacik P., Barnard T.J., Noinaj N., Felek S., Tsang T.M., et al. Structural insights into Ail-mediated adhesion in *Yersinia pestis*. *Structure*. 2011; 19(11): 1672–82. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.08.010>
16. Chauvaux S., Dillies M.A., Marceau M., Rosso M.L., Rousseau S., Moszer L., et al. *In silico* comparison of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* transcriptomes reveals a higher expression level of crucial virulence determinants in the plague bacillus. *Int. J. Med. Microbiol.* 2011; 301(2): 105–16. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.08.013>
17. Utkin D.V., Bulgakova E.G., Erokhin P.S., Kuznetsov O.S., Kuklev V.E., Osina N.A. Study of the morphological features of the cells of the bacteria *Yersinia pestis*, grown at different temperatures by atomic force microscopy. *Izvestiya Saratovskogo universiteta. Novaya seriya. Seriya: Khimiya. Biologiya. Ekologiya*. 2019; 19(1): 87–93. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2019-19-1-87-93> (in Russian)
18. Arseni L., Lombardi A., Orioli D. From structure to phenotype: impact of collagen alterations on human health. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19(5): 1407. <https://doi.org/10.3390/ijms19051407>
19. Karsdal M.A., ed. *Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin*. Oxford: Academic Press; 2019. <https://doi.org/10.1016/C2018-0-00074-2>
20. Byvalov A.A., Konyshev I.V. *Yersinia pseudotuberculosis*-derived adhesins. *Infektsiya i immunitet*. 2019; 9(3–4): 437–48. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2019-3-4-437-448> (in Russian)
21. Ma C.D., Acevedo-Vélez C., Wang C., Gellman S.H., Abbott N.L. Interaction of the hydrophobic tip of an atomic force microscope with oligopeptides immobilized using short and long tethers. *Langmuir*. 2016; 32(12): 2985–95. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b04618>
22. Iqbal K.M., Bertino M.F., Shah M.R., Ehrhardt C.J., Yadavalli V.K. Nanoscale phenotypic textures of *Yersinia pestis* across environmentally-relevant matrices. *Microorganisms*. 2020; 8(2): 160. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020160>
23. Pleskova S.N., Dubrovin E.V., Golubeva I.S., Gorshkova E.N., Pudovkina E.E. Nanotechnology AFM-morphometry of bacte-

REFERENCES

1. Ribet D., Cossart P. How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. *Microbes Infect.* 2015; 17(3): 173–83. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.01.004>
2. Tsang T.M., Annis D.S., Kronshage M., Fenno J.T., Usselman L.D., Mosher D.F., et al. Ail protein binds ninth type III fibronectin repeat (9FNIII) within central 120-kDa region of fibronectin to facilitate cell binding by *Yersinia pestis*. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(20): 16759–67. <https://doi.org/10.1074/jbc.m112.358978>
3. Vaca D.J., Thibau A., Schütz M., Kraiczky P., Happonen L., Malmström J., et al. Interaction with the host: the role of fibronectin and extracellular matrix proteins in the adhesion of Gram-negative bacteria. *Med. Microbiol. Immunol.* 2020; 209(3): 277–99. <https://doi.org/10.1007/s00430-019-00644-3>
4. Kуклева L.M. Adhesines of the plague agent. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2018; (2): 14–22. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2018-2-14-22> (in Russian)
5. Eddy J.L., Gielda L.M., Caulfield A.J., Rangel S.M., Latham W.W. Production of outer membrane vesicles by the plague pathogen *Yersinia pestis*. *PLoS One*. 2014; 9(9): e107002. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107002>
6. Qing G., Gong N., Chen X., Chen J., Zhang H., Wang Y., et al. Natural and engineered bacterial outer membrane vesicles. *Biophys. Rep.* 2019; 5(4): 184–98. <https://doi.org/10.1007/s41048-019-00095-6>
7. Dubrovina V.I., Mukhturgin G.B., Balakhonov S.V., Vityazeva S.A., Starovoytova T.P., Ivanova T.A. et al. Studying of immunophysiological properties of *Yersinia pestis* strains with various plasmid composition. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2013; (6): 136–9. (in Russian)

- rial cells. *Vestnik of Lobachevsky of State University of Nizhny Novgorod*. 2013; (2-2): 34–8. (in Russian)
24. Yuan Y., Hays M.P., Hardwidge P.R., Kim J. Surface characteristics influencing bacterial adhesion to polymeric substrates. *RSC Advances*. 2017; 7: 14254–61. <https://doi.org/10.1039/c7ra01571b>
25. Evseeva V.V., Platonov M.E., Kopylov P.Kh., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. Plasminogen activator of *Yersinia pestis*. *Infectsiya i immunitet*. 2015; 5(1): 27–36. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2015-1-27-36> (in Russian)
26. Kukleva L.M., Boyko A.V. Plasminogen activator — multifunctional protein of plague pathogen. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2016; (3): 13–20. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-3-13-20> (in Russian)
27. Kienle Z., Emody L., Svanborg C., O'Tool P.W. Adhesive properties conferred by the plasminogen activator of *Yersinia pestis*. *J. Gen. Microbiol.* 1992; 138(Pt. 8): 1679–87.
28. Zhang P., Skurnik M., Zhang S., Schwartz O., Kalyanasundaram R., Bulgheresi S., et al. Human dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin (CD209) is a receptor for *Yersinia pestis* that promotes phagocytosis by dendritic cells. *Infect. Immun.* 2008; 76(5): 2070–9. <https://doi.org/10.1128/IAI.01246-07>
29. Yang K., He Y., Park C.G., Kang Y.S., Zhang P., Han Y., et al. *Yersinia pestis* interacts with SIGNR1 (CD209b) for promoting host dissemination and infection. *Front. Immunol.* 2019; 10: 96. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00096>
30. Byvalov A.A., Kononenko V.L., Konyshov I.V. Single-cell force spectroscopy of interaction of lipopolysaccharides from *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* with J774 macrophage membrane using optical tweezers. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A*. 2018; 12: 93–106. <https://doi.org/10.1134/S1990747818020058>
31. Knirel' Yu.A., Anisimov A.P. Lipopolysaccharide of *Yersinia pestis*, the cause of plague: structure, genetics, biological properties. *Acta Naturae*. 2012; 4(3): 49–61. <https://doi.org/10.32607/20758251-2012-4-3-46-58> (in Russian)
32. Wang C., Stanciu C.E., Ehrhardt C.J., Yadavalli V.K. The effect of growth temperature on the nanoscale biochemical surface properties of *Yersinia pestis*. *Anal. Bioanal. Chem.* 2016; 408(40): 5585–91. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9659-9>
33. Montminy S., Khan N., McGrath S., Walkowicz M. J., Sharp F., Conlon J.E., et al. Virulence factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response. *J. Nature Immun.* 2006; 7(10): 1066–73. <https://doi.org/10.1038/ni1386>

Информация об авторах

Щуковская Татьяна Николаевна[✉] — д.м.н., проф., г.н.с. отд. иммунологии РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, tatyanaschuk@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8995-0894>

Гончарова Анастасия Юрьевна — к.м.н., н.с. отд. иммунологии, РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9994-7936>

Бугоркова Светлана Александровна — д.м.н., и.о. зав. отд. иммунологии РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7548-4845>

Ерохин Павел Сергеевич — к.ф.-м.н., н.с. лаб. диагностических технологий РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9525-8327>

Кудрявцева Ольга Михайловна — к.б.н., с.н.с. отд. иммунологии, РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9894-3394>

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 28.10.2020;
принята к публикации 14.12.2021
опубликована 10.03.2021

Information about the authors

Tatyana N. Shchukovskaya[✉] — D. Sci. (Med.), Prof., main researcher, Department of immunology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, tatyanaschuk@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8995-0894>

Anastasiya Y. Goncharova — Cand. Sci. (Med.), researcher, Department of immunology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9994-7936>

Svetlana A. Bugorkova — D. Sci. (Med.), deputy head, Department of immunology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7548-4845>

Pavel S. Erokhin — Cand. Sci. (Phys.-Math.), researcher, Laboratory of diagnostic technologies, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9525-8327>

Olga M. Kudryavtseva — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Department of immunology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9894-3394>

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 28.10.2020;
accepted for publication 14.12.2021;
published 10.03.2021



Молекулярно-генетический анализ вариантов вируса Западного Нила, циркулировавших на территории европейской части России в 2010–2019 гг.

Батурин А.А.[✉], Ткаченко Г.А., Леденева М.Л., Лемасова Л.В., Бондарева О.С., Кайсаров И.Д., Шпак И.М., Бородай Н.В., Король Е.В., Тетерятникова Н.Н.

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Волгоград, Россия

Аннотация

Цель. Изучение распространённости генотипов и геновариантов вируса Западного Нила (ВЗН) на территории юга России в 2010–2019 гг.

Материалы и методы. Для исследования использовали 311 инфицированных ВЗН образцов биологического материала от больных, переносчиков и резервуаров инфекции. Типирование ВЗН проводили посредством сконструированных 3 пар праймеров и 3 зондов методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени и секвенированием участка генома ВЗН размером 277 п.н., соответствующего 5'-нетранслируемой области и локусу гена полипротеина, кодирующему капсидный белок. Анализ результатов секвенирования проводили с помощью программы «Nucleotide BLAST» (NCBI).

Результаты. Из 311 РНК-изолятов ВЗН 15 (4,82%) были отнесены к генотипу 1 (из Астраханской и Волгоградской областей, Краснодарского и Ставропольского краёв, Республики Татарстан), 285 (91,64%) — к генотипу 2 (из Астраханской, Волгоградской, Воронежской, Курской, Липецкой, Пензенской, Ростовской и Саратовской областей, Краснодарского и Ставропольского краёв, республик Калмыкия и Крым) и 11 (3,54%) — к генотипу 4 (из Волгоградской области, республик Калмыкия и Крым). Отмечено выраженное преобладание по частоте встречаемости вируса генотипа 2. Установлено, что выявленные изоляты возбудителя генотипа 1 относятся к астраханскому геноварианту, генотипа 2 — к российскому и европейскому геновариантам. Обнаружены ранее не встречавшиеся варианты ВЗН генотипов 1 и 4.

Заключение. В последнее десятилетие ВЗН генотипа 2 является доминирующим для юга европейской части России. Наиболее распространён российский вариант, его ареал расширяется. Циркуляция различных генетических линий ВЗН на территории России свидетельствует о необходимости дальнейшего изучения их распространения, а также совершенствования диагностических методов и тест-систем для выявления и дифференциации штаммов возбудителя.

Ключевые слова: вирус Западного Нила, генотип, Референс-центр

Этическое утверждение. Исследование проведено при информированном согласии пациентов. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010), протокол исследования одобрен Комитетом по биоэтике Волгоградского научно-исследовательского противочумного института (протокол № 3 от 05.04.2019).

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

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

Для цитирования: Батурин А.А., Ткаченко Г.А., Леденева М.Л., Лемасова Л.В., Бондарева О.С., Кайсаров И.Д., Шпак И.М., Бородай Н.В., Король Е.В., Тетерятникова Н.Н. Молекулярно-генетический анализ вариантов вируса Западного Нила, циркулировавших на территории европейской части России в 2010–2019 гг. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(3):308–318.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-85>

Molecular genetic analysis of West Nile virus variants circulating in European Russia between 2010 and 2019

Artem A. Baturin[✉], Galina A. Tkachenko, Margarita L. Ledeneva, Lyudmila V. Lemasova, Ol'ga S. Bondareva, Il'ya D. Kaysarov, Ivan M. Shpak, Natal'ya V. Boroday, Ekaterina V. Korol', Natal'ya N. Teteryatnikova

Volgograd Research Institute for Plague Control, Volgograd, Russia

Abstract

Aim. A study of the prevalence of West Nile virus (WNV) genetic lineages and genovariants in the south of European Russia between 2010 and 2019.

Materials and methods. The study was carried out on 311 WNV containing biological samples from patients, vectors and reservoirs of infection. WNV typing was carried out using reverse transcription and real-time polymerase chain reaction with designed three pairs of primers and three probes and by the sequencing of the 277 bp WNV genome region corresponding to the 5'-untranslated region and locus of the polyprotein gene encoding the capsid protein C. Sequencing results were analyzed using the Nucleotide BLAST software (NCBI).

Results. As a result of typing, out of 311 WNV RNA isolates taken for the study, 15 (4.82%) were assigned to lineage 1 (from Astrakhan and Volgograd regions, Krasnodar and Stavropol Territories, Republic of Tatarstan), 285 (91.64%) to lineage 2 (from Astrakhan, Volgograd, Voronezh, Kursk, Lipetsk, Penza, Rostov and Saratov regions, Krasnodar and Stavropol Territories, Republics of Kalmykia and Crimea), and 11 (3.54%) to lineage 4 (from the Volgograd region, Republics of Kalmykia and Crimea). The predominance of viral lineage 2 was demonstrated. The identified isolates of the viral lineage 1 belonged to the «Astrakhan» variant, isolates of lineage 2 belonged to «Russian» and «European» variants. Previously uncommon WNV variants of lineages 1 and 4 were also found.

Conclusion. Lineage 2 of WNV prevailed in the south of European Russia in the last decade. The «Russian» variant is most common and its area is expanding. The circulation of various WNV genetic lineages in Russia indicates the need for further study of their spread and improving diagnostic methods and test systems for identifying and differentiating pathogen strains.

Keywords: West Nile virus, genetic lineage, Reference Center

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Volgograd Research Institute for Plague Control (protocol 3, 05.04.2019).

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

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

For citation: Baturin A.A., Tkachenko G.A., Ledeneva M.L., Lemasova L.V., Bondareva O.S., Kaysarov I.D., Shpak I.M., Boroday N.V., Korol' E.V., Teteryatnikova N.N. Molecular genetic analysis of West Nile virus variants circulating in European Russia between 2010 and 2019. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(3):308–318.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-85>

Лихорадка Западного Нила (ЛЗН) — природно-очаговая арбовирусная инфекция с трансмиссивным механизмом передачи, имеющая глобальное распространение. Клинические проявления ЛЗН разнообразны и варьируют от бессимптомного течения до развития тяжёлых осложнений в форме менингита и менингоэнцефалита [1, 2]. Тяжесть заболевания может быть связана как с потенциалом вирулентности возбудителя, так и с иммунным статусом инфицированного. Причиной заболевания является вирус Западного Нила (ВЗН, West Nile virus), который принадлежит семейству *Flaviviridae*, роду *Flavivirus*, антигенному комплексу японского энцефалита.

Геномы различных штаммов ВЗН характеризуются значительной генетической вариабельно-

стью. По современным данным, изоляты ВЗН можно разделить на 9 генотипов (генетических линий) [3, 4]. Дифференциация ВЗН на генотипы основана на сравнительном анализе полноразмерных нуклеотидных последовательностей генома. Генетическая дистанция между генотипами ВЗН составляет 18–27% [5]. В России достоверно зарегистрирована циркуляция генотипов 1, 2 и 4 ВЗН [6].

К генотипу 1 относят изоляты ВЗН, близкие к штамму Eg101, выделенному в 1951 г. из крови клинически здорового ребёнка в Египте (NCBI GenBank: AF260968), к генотипу 2 — изоляты, близкие к прототипному штамму B956, выделенному в 1936 г. из крови больной женщины в Уганде (NCBI Reference Sequence: NC_001563; GenBank:

M12294). Для ВЗН генотипа 4 прототипным является штамм LEIV-Krd88-190, выделенный от иксодовых клещей *Dermacentor marginatus*, собранных в 1988 г. в предгорных районах Северного Кавказа (NCBI GenBank: AY277251) [7].

Штаммы ВЗН генотипов 1 и 2 являются патогенными для человека. Природными резервуарами ВЗН генотипов 1 и 2 служат птицы, а в качестве основных переносчиков выступают орнитофильные комары. Поддержанию циркуляции вируса в природных очагах ЛЗН способствуют также иксодовые, гамазовые и аргасовые клещи. Человека, лошадей и прочих млекопитающих рассматривают в качестве тупиковых хозяев ВЗН генотипов 1 и 2, поскольку уровень вирусной нагрузки у них является недостаточным для инфицирования переносчиков [8]. Известными на сегодняшний день резервуарами ВЗН генотипа 4 являются озёрные лягушки *Rana ridibunda*, а основными переносчиками — комары *Uranotaenia unguiculata*. Патогенность ВЗН генотипа 4 для млекопитающих не доказана [9, 10].

В России с 1999 по 2003 г. на территориях Волгоградской и Астраханской областей была установлена циркуляция двух родственных генетических вариантов ВЗН генотипа 1 — волгоградского и астраханского [9]. Однако в 2004 г. на территории Ростовской области, а в 2007 и в 2010 гг. на территории Волгоградской области вспышки ЛЗН были вызваны российским геновариантом ВЗН генотипа 2 [9]. Генотип 4 на территории России выделяли от клещей *Dermacentor marginatus* в Краснодарском крае, от комаров *Anopheles hyrcanus* в Астраханской области, от комаров *Uranotaenia unguiculata* и озерных лягушек *Rana ridibunda* в Волгоградской области [9, 10]. С 2008 г. на базе Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора функционирует Референс-центр по мониторингу за возбудителем ЛЗН, одной из главных задач которого является изучение молекулярно-генетических свойств штаммов ВЗН, выделяемых на территории России.

Целью данной работы являлось изучение распространённости генотипов и геновариантов ВЗН на территории юга России в 2010–2019 гг.

Материалы и методы

Для исследования использовали инфицированные ВЗН образцы клинического, аутопсийного и полевого материала, полученные из Референс-центра по мониторингу за возбудителем ЛЗН. В качестве клинических образцов использовали пробы цельной крови, сыворотки и плазмы крови, мочи и ликвора. Образцами аутопсийного материала служили ткани головного мозга и внутренних органов больных, умерших в результате развития нейроинвазивных форм ЛЗН. В качестве полевого материала использовали пробы от птиц и комаров. От птиц

отбирали головной мозг и внутренние органы. Комаров распределяли на пулы по видам. Непосредственно перед выделением РНК образцы тканей человека и животных, а также пулы членистоногих гомогенизировали в физиологическом растворе с помощью гомогенизатора «Precellys 24» («Vertin Technologies»).

Выделение РНК осуществляли с использованием коммерческих наборов реагентов «РИБО-золь-С» и «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) в соответствии с инструкциями производителя.

Наличие РНК ВЗН в пробах подтверждали методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в реальном времени на приборе «Rotor-Gene 6000» («Corbett Research») с использованием набора реагентов «АмплиСенс WNV-FL» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора) в соответствии с инструкцией производителя.

Типирование ВЗН проводили методом ОТ-ПЦР в реальном времени на приборе «Rotor-Gene 6000» («Corbett Research») посредством разработанных 3 пар праймеров и 3 зондов, специфично выявляющих генотипы 1, 2 и 4 ВЗН:

- *WNV-1type-F* 5'-GCGTGTGTCCTTGATTG-3',
WNV-1type-R 5'-GTTCACACCTCCATCG-3',
WNV-1type-P 5'-(FAM)CCTGTGTTGGCGTTCTT CAGGTTACAGG(BHQ1)-3' — для выявления генотипа 1 (патент РФ № 2715625 от 02.03.2020);
- *WNV-2type-F* 5'-GCTATGCTGAGTCTGATTG-3',
WNV-2type-R 5'-CCTCTCCATGTCCAG-3',
WNV-2type-P 5'-(ROX)CCCAATACGTTTCGTG TTGGCTCTTTGGG(BHQ2)-3' — для выявления генотипа 2 (патент РФ № 2715617 от 02.03.2020);
- *WNV-4type-F* 5'-GCGTGTGTCCTTAATAG-3',
WNV-4type-R 5'-CACCTCCATCTGTCC-3',
WNV-4type-P 5'-(JOE)CTCGTGGCCYTG YTGAC GTTTTACAGG(BHQ1)-3' — для выявления генотипа 4 (патент РФ № 2737396 от 30.11.2020).

Олигонуклеотиды конструировали с помощью программ «Oligo 7», «PerlPrimer v1.1.21». Результаты ОТ-ПЦР в реальном времени оценивали по наличию или отсутствию пересечения кривой накопления флюоресценции с пороговой линией, что определялось значением порогового цикла (cycle threshold — Ct). Положительными считали образцы, для которых значение Ct не превышало 33.

Секвенирование положительных образцов с высокой концентрацией вирусной РНК проводили по участку генома ВЗН размером 277 п.н., соответствующему 5'-нетранслируемой области (5'-UTR), и локусу гена полипротеина, кодирующему капсидный белок (protC), на автоматическом генетическом анализаторе «ABI Prism 3130» («Applied Biosystems»). Секвенированный фрагмент по локализации соответствовал позиции с 34 по 310 нуклеотид в геноме ВЗН (NCBI Reference Sequence:

NC 001563). Ампликоны получали методом ОТ-ПЦР со специфичными праймерами, фланкирующими данный участок генома, с использованием амплификатора «Терцик» («НПО ДНК-Технология»). Для проведения реакции циклического секвенирования использовали набор «BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit» («Applied Biosystems»).

Результаты секвенирования анализировали, сравнивая полученные нуклеотидные последовательности с таковыми из базы данных GenBank (NCBI) с помощью программы «Nucleotide BLAST» (NCBI). Филогенетическое дерево строили методом Neighbor-joining с использованием модели для подсчёта матрицы расстояний Kimura 2 в компьютерной программе «MEGA 7» (Pennsylvania State University).

Результаты

В период с 2010 по 2019 г. в Референс-центре по мониторингу за возбудителем ЛЗН проведено исследование 7922 проб, из них в 589 случаях обнаружена РНК ВЗН. Для определения генотипа ВЗН отобрано 311 положительных образцов. Пробы с низкой вирусной нагрузкой ($Ct > 30$) были исключены из исследования.

В результате проведённого типирования методом ОТ-ПЦР из 311 РНК-изолятов ВЗН, взятых для исследования, 15 (4,82%) были отнесены к генотипу 1, 285 (91,64%) — к генотипу 2, и 11 (3,54%) — к генотипу 4 (табл. 1, 2).

ВЗН генотипа 1 выявлен у больных из Астраханской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, Республики Татарстан, а также в пулах комаров, отловленных на территории Волгоградской области.

ВЗН генотипа 2 обнаружен в клиническом материале от больных из Астраханской, Волгоградской, Воронежской, Курской, Липецкой, Пензенской, Ростовской и Саратовской областей, Краснодарского и Ставропольского краёв, Республики Крым. При исследовании образцов полевого материала генотип 2 ВЗН установлен для пулов комаров, отловленных на территории Астраханской и Волгоградской областей, Республики Калмыкия и проб суспензий органов птиц, отловленных на территориях Волгоградской и Саратовской областей.

ВЗН генотипа 4 обнаружен в пробах суспензий пулов комаров, отловленных на территориях Волгоградской области, Республики Калмыкия и Республики Крым.

Для определения циркулировавших геновариантов ВЗН было проведено секвенирование 6 РНК-изолятов ВЗН генотипа 1 (ASTRAKHAN 925-2012; ASTRAKHAN 143-2016; ASTRAKHAN 612-2018; STAVROPOL 810-2012; TATARSTAN 435-2018; VOLGOGRAD 1115-2016), 12 РНК-изолятов ВЗН генотипа 2 (ROSTOV 1471-2012; ROSTOV 633-2018; SARATOV 1367-2012; SARATOV 2954-

2013; SARATOV 403-2015; VOLGOGRAD 613-2010; VOLGOGRAD 410-2012; VOLGOGRAD 2481-2013; VOLGOGRAD 833-2014; VOLGOGRAD 2924-2014; VOLGOGRAD 703-2018; VORONEZH 718-2018) и 6 РНК-изолятов ВЗН генотипа 4 (CRIMEA-1078-2018; KALMYKIA-958-2018; KALMYKIA-960-2018; KALMYKIA-962-2018; KALMYKIA-971-2018; VOLGOGRAD-973-2018).

При сравнительном анализе нуклеотидных последовательностей, полученных в результате секвенирования ВЗН генотипа 1, выявленного на территории Астраханской и Волгоградской областей, а также Ставропольского края, была установлена высокая степень гомологии (99,28–99,64%) с последовательностью штамма ВЗН генотипа 1, циркулировавшего на территории Астраханской области в 1999 г. (Ast99-901, GenBank: AY278441). На дендрограмме данные изоляты кластеризовались в отдельную группу, представляющую собой астраханский геновариант ВЗН генотипа 1 (рис. 1). Полученные результаты коррелировали с данными сравнительного анализа нуклеотидной последовательности (5'-UTR-protC) изолята ВЗН 141_Astr_03_M, выделенного в 2003 г. специалистами ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора из пула комаров, отловленных на территории Астраханской области. Данный изолят был идентичен клиническому штамму ВЗН Ast99-901 [6].

Единичный случай ЛЗН 2018 г. в Татарстане, причиной которого было инфицирование вирусом генотипа 1 (изолят ВЗН TATARSTAN 435-2018), являлся завозным из Индии. На дендрограмме данный изолят формировал отдельную ветвь и не входил в группу астраханских штаммов. Гомология полученной нуклеотидной последовательности изолята из Татарстана с аналогичными последовательностями для астраханского (Ast99-901, GenBank: AY278441) и индийского (68856-ICDC-4, GenBank: KT163243) штаммов составляла 98,56 и 96,75% соответственно.

Секвенирование изолятов генотипа 2, выделенных в разных регионах, показало их генетическую неоднородность, выражающуюся в наличии однонуклеотидных замен. Последовательности, полученные для изолятов из Волгоградской, Ростовской и Саратовской областей, обладали гомологией до 99–100% с последовательностями штаммов, циркулировавших на территории Волгоградской области в 2007 г. (Reb_VLG_07_H, GenBank: FJ425721) и на территории Румынии в 2013 г. (Hyalomma/Romania/2013, GenBank: KJ934710). Данные изоляты на дендрограмме составляли ветвь, включившую в себя группу штаммов ВЗН российского геноварианта генотипа 2, характеризующихся наличием полиморфизма по локусу protC, выражающегося в наличии однонуклеотидных замен (рис. 2). Похожие данные были получены А.Е. Платоновым и соавт. в

Таблица 1. Генотипы ВЗН, выявленного у больных с 2010 по 2019 г.
Table 1. Genetic lineages of WNV detected in patients from 2010 to 2019

Регион России Region of Russia	Количество изолятов ВЗН определённого генотипа по годам Number of WNV isolates of a certain genetic lineage by years																						
	2010		2011		2012		2013		2014		2015		2016		2017		2018		2019		всего / total		
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
Астраханская область Astrakhan Region	-	-	-	-	2 (1)	0	2 (1)	0	-	-	1 (1)	0	1 (1)	0	-	-	1 (1)	1 (0)	0	2 (0)	0	7 (5)	3 (0)
Волгоградская область Volgograd Region	0	9 (3)	0	9 (0)	0	22 (4)	0	15 (2)	0	3 (0)	-	0	2 (0)	-	-	0	14 (0)	0	10 (1)	0	84 (10)	0	
Воронежская область Voronezh Region	-	-	0	1 (0)	0	3 (0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1 (1)	0	0	0	0	5 (1)
Курская область Kursk Region	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	2 (0)	0	2 (0)	0
Липецкая область Lipetsk Region	-	-	-	-	0	1 (0)	-	-	-	-	-	0	1 (0)	-	-	-	-	-	0	1 (0)	0	3 (0)	0
Пензенская область Penza Region	-	-	-	-	-	-	0	1 (0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1 (0)	0
Ростовская область Rostov Region	-	-	-	-	0	5 (0)	0	1 (0)	-	-	-	-	-	-	-	-	0	4 (1)	0	7 (3)	0	17 (4)	0
Саратовская область Saratov Region	-	-	-	-	0	2 (0)	0	20 (0)	0	1 (0)	0	5 (0)	0	53 (0)	-	-	-	-	-	-	0	81 (0)	0
Краснодарский край Krasnodar Territory	-	-	1 (0)	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	8 (0)	1 (0)	8 (0)	0
Ставропольский край Stavropol Territory	-	-	-	-	1 (1)	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1 (0)	0	1 (0)	1 (1)	2 (0)	0
Республика Крым Republic of Crimea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1 (0)	-	-	0	1 (0)	0
Республика Татарстан Republic of Tatarstan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (0)	0	-	-	1 (0)	0	0

Примечание. В скобках указано количество больных ЛЗН с летальным исходом. Символом «-» обозначено отсутствие положительных проб.
Note. The number of fatal WNV patients is indicated in brackets. The symbol «-» indicates absence of samples.

Таблица 2. Генотипы вируса Западного Нила, выявленного в резервуарах и переносчиках с 2011 по 2019 г.
Table 2. Genetic lineages of West Nile virus detected in reservoir and vectors from 2011 to 2019

Регион России Region of Russia	Вид резервуара или переносчика ВЗН Species of reservoir or vector WNV	Количество изолятов ВЗН определённого генотипа по годам Number of WNV isolates of a certain genetic lineage by years																				
		2011		2012		2013		2014		2015		2016		2017		2018		2019		Всего / total		
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	4
Астраханская область Astrakhan Region	<i>Culex pipiens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	<i>Aedes caspius</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	<i>Aedes pulchritarsis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	<i>Aedes vexans</i>	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	<i>Anopheles hyrcanus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	<i>Coquillettidia richiardii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	<i>Culex modestus</i>	-	-	-	-	-	-	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15
	<i>Culex pipiens</i>	-	-	-	-	0	1	0	3	-	-	-	2	0	1	0	10	0	0	10	0	2
	<i>Uranotaenia unguiculata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	<i>Hyalomma marginatum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Саратовская область Saratov Region	<i>Corvus cornix</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	<i>Larus cachinnans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	<i>Phasianus colchicus</i>	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	<i>Corvus cornix</i>	-	-	-	-	-	-	0	1	-	-	0	2	-	-	-	-	-	-	-	-	3
	<i>Corvus frugilegus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	7	-	-	-	-	-	-	-	-	7
	<i>Corvus monedula</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
	<i>Larus argentatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	<i>Luscinia svecica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	<i>Parus major</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	<i>Pica pica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	3	-	-	-	-	0	1	0	-	-	4
Республика Крым Republic of Crimea	<i>Sterna hirundo</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	<i>Culex modestus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1	0	-	-	-	1
	<i>Uranotaenia unguiculata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	9	-	-	0	
	<i>Culex spp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	1	-	-	0	
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	1	-	-	0	

Примечание. Символом «-» обозначено отсутствие положительных проб.
Note. The symbol «-» indicates absence of samples.

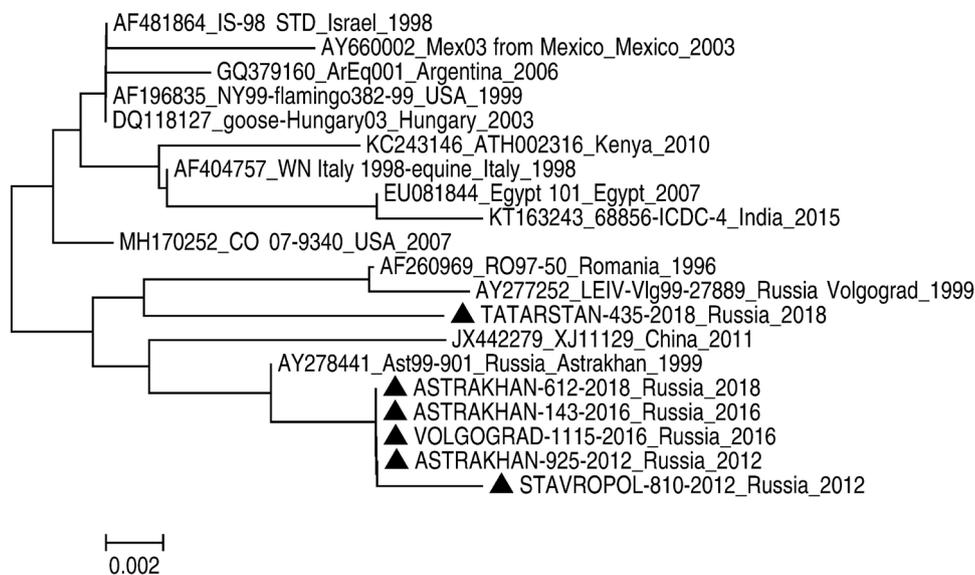


Рис. 1. Филогенетическое дерево по локусу 5'-UTR-protC ВЗН генотипа 1, построенное методом Neighbor-joining.

Треугольниками отмечены изоляты, секвенированные в ходе работы.

Fig. 1. The phylogenetic tree based on 5'-UTR-protC locus of WNV lineage 1 built by the Neighbor-joining method.

The triangles mark isolates sequenced in this study.

2010 г. при секвенировании изолятов ВЗН, выявленных в аутоптатах и сыворотках крови пациентов из Волгоградской области. При этом была обнаружена 99,5–99,9% гомология с изолятами ВЗН, выделенными на той же территории в 2007 г. [6].

Для воронежского изолята генотипа 2, выявленного в 2018 г., полученная нуклеотидная последовательность имела 100% гомологию с последовательностями штаммов ВЗН, циркулировавших в течение последних 15 лет на территории Болгарии, Греции, Венгрии и Италии (европейский геновариант), что, возможно, свидетельствует о заносе вируса на территорию России из стран Европы.

При секвенировании РНК-изолятов ВЗН генотипа 4 из Волгоградской области и Республики Калмыкия была выявлена их идентичность волгоградскому изоляту (100% гомология), выделенному в 2006 г. (101_5-06-Uu, GenBank: FJ159129). А изолят ВЗН из Крыма существенно отличался по числу и локализации нуклеотидных замен от остальных, выделенных на территории России в разные годы, и формировал обособленную ветвь на дендрограмме (рис. 3). Гомология последовательности изолята ВЗН из Крыма (CRIMEA-1078-2018) с последовательностями прототипного штамма (LEIV-Krd88-190) и изолята из Волгограда (101_5-06-Uu) составляла 98,56 и 98,19% соответственно.

Обсуждение

Определение генотипа ВЗН является важной составляющей эпидемиологического мониторинга для изучения путей распространения вируса, выявления связи между его генетическими вариантами

и клиническими формами ЛЗН, разработки и совершенствования средств диагностики ЛЗН.

Данные, полученные в работе, свидетельствовали о том, что в 2010–2019 гг. на территории европейской части России циркулировали ВЗН генотипов 1, 2 и 4. Выявленные изоляты возбудителя относились к астраханскому геноварианту генотипа 1, российскому и европейскому геновариантам генотипа 2. Обнаружены новые, ранее не встречавшиеся, варианты ВЗН генотипов 1 и 4. Установлено преобладание генотипа 2 вируса в большинстве субъектов юга России, как в клинических образцах, так и в полевом материале. Генотипы 1 и 4 менее распространены и приурочены к конкретным биотопам.

Основным очагом вируса генотипа 1 на юге европейской части России является дельта Волги, непосредственно расположенная на территории Астраханской области. По данным эпиданамнеза, единственный случай ЛЗН 2018 г. в Татарстане, вызванный вирусом генотипа 1, являлся результатом завоза инфекции из Индии. Выявленные в 2012 г. в Ставрополе и 2016 г. в Волгограде изоляты ВЗН генотипа 1, вероятно, были занесены из Астраханской области, на что указывают данные секвенирования. Циркулировавший на территории Волгоградской области с 1999 по 2003 г. волгоградский геновариант генотипа 1 ВЗН за изучаемый период выявлен не был. Принимая во внимание данные А.Е. Платонова и соавт. [9], вероятно, он был полностью вытеснен или замещён генотипом 2. Вновь выявленные находки ВЗН генотипа 1 в полевом материале, возможно, говорят о новом занесении вируса из

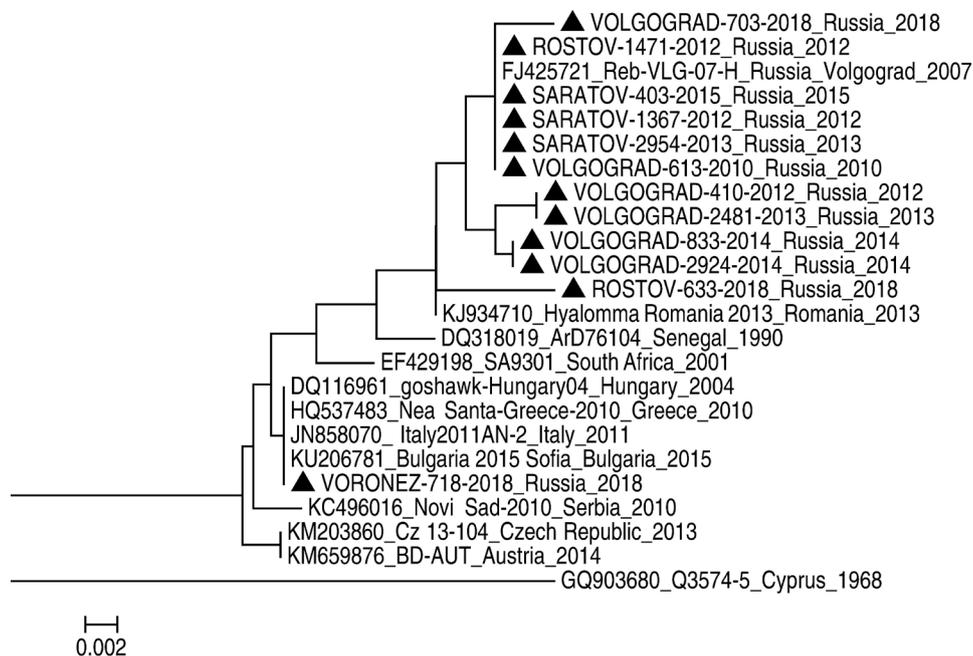


Рис. 2. Филогенетическое дерево по локусу 5'-UTR-protC ВЗН генотипа 2, построенное методом Neighbor-joining. Треугольниками отмечены изоляты, секвенированные в ходе работы.

Fig. 2. The phylogenetic tree based on 5'-UTR-protC locus of WNV lineage 2 built by the Neighbor-joining method. The triangles mark isolates sequenced in this study.

Астраханской области в соседние регионы перелётными птицами. Появление астраханского генотипа генотипа 1 ВЗН в Волгоградской области объясняется особенностями её географического положения, которая на юге и юго-востоке граничит с Астраханской областью.

ВЗН генотипа 2 является доминирующим для всего юга европейской части России. Наиболее распространён российский вариант, изоляты которого, по данным секвенирования, генетически полиморфны. Тем не менее зарегистрирована циркуляция и европейского генотипа ВЗН генотипа 2 в России.

Генотип 4, на наш взгляд, изучен недостаточно. Однако на данный момент можно сказать, что тростниковые заросли Сарпинских озер Волгоградской области и Республики Калмыкия являются биотопами, на территориях которых циркулирует такой достаточно редкий тип ВЗН. Следует отметить, что в 2013 г. на территории Австрии из пула комаров *Ur. unguiculata* был выделен штамм ВЗН WNV-Uu-LN-AT-2013 [3]. Однако гомология полученной полногеномной последовательности данного штамма с таковой для российского изолята ВЗН генотипа 4 101_5-06-Uu составляла всего 96,2%. Существенные различия в гомологии заставили авторов отнести штамм ВЗН WNV-Uu-LN-AT-2013 к отдельному генотипу 9 [3].

Широкое распространение ВЗН генотипа 2, наблюдаемое в изучаемый период на юге России, имело место и в странах Европы. Так, во время крупной

вспышки ЛЗН 2010 г. на территории Греции в пуле комаров *Culex pipiens*, отловленных в окрестностях города Неа Санта, методом секвенирования был установлен генотип 2 ВЗН. Анализ полученной нуклеотидной последовательности показал высокую степень гомологии с последовательностью штамма, выделенного в Венгрии в 2004 г. [11]. В августе 2013 г. из клеща *Hyalomma marginatum marginatum*, собранного с певчего дрозда в дельте Дуная на территории Румынии, был выделен ВЗН генотипа 2. Результаты секвенирования показали, что данный штамм является генетически родственным российскому штамму ВЗН Reb_VLG_07_H, выделенному в

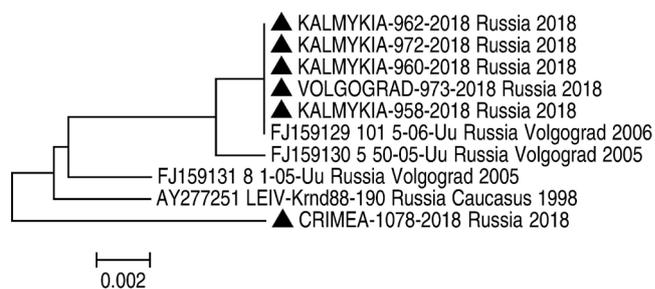


Рис. 3. Филогенетическое дерево по локусу 5'-UTR-protC ВЗН генотипа 4, построенное методом Neighbor-joining. Треугольниками отмечены изоляты, секвенированные в ходе работы.

Fig. 3. The phylogenetic tree based on 5'-UTR-protC locus of WNV lineage 4 built by the Neighbor-joining method. The triangles mark isolates sequenced in this study.

2007 г. в Волгограде [12]. В том же году были обнаружены и выделены 4 практически идентичных штамма ВЗН генотипа 2 от комаров *Culex modestus*, собранных в Южной Моравии (Чехия). Филогенетический анализ показал, что выделенные штаммы ВЗН тесно связаны с австрийскими, итальянскими и сербскими штаммами [13]. ВЗН генотипа 2 в дальнейшем выявляли также на территориях Австрии, Венгрии, Болгарии, Германии, Италии и Испании [14–21]. Тем не менее наряду с генотипом 2 в Европе за последние 10 лет регистрировали случаи ЛЗН, вызванные ВЗН генотипа 1. Так, в осенний период 2011 г. на острове Сардиния (Италия) были зарегистрированы 9 случаев заболевания ЛЗН. Методом секвенирования у 3 больных удалось установить наличие ВЗН генотипа 1, а у одного — генотипа 2 [22].

Приведённые данные указывают на то, что в последнее десятилетие ВЗН генотипа 2 является наиболее распространённым на территории Европейского континента. Идёт расширение его ареала.

Таким образом, циркуляция различных генетических линий ВЗН на территории России свидетельствует о необходимости дальнейшего изучения их распространения, а также совершенствования диагностических методов и тест-систем для выявления и дифференциации штаммов возбудителя.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Львов Д.К. Лихорадка Западного Нила. *Вопросы вирусологии*. 2000; 45(2): 4–9.
2. Sejvar J. West Nile Virus Infection. *Microbiol Spectr*. 2016; 4(3): E110-0021-2016. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.E110-0021-2016>
3. Pachler K., Lebl K., Berer D., Rudolf I., Hubalek Z., Nowotny N. Putative new West Nile virus lineage in *Uranotaenia unguiculata* mosquitoes, Austria, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20(12): 2119–22. <https://doi.org/10.3201/eid2012.140921>
4. Жуков К.В., Топорков А.В., Викторов Д.В. Эпидемиологические аспекты и современная эволюция глобально распространяющихся арбовирусов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2018; 95(6): 94–102. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-6-94-102>
5. Анищенко М., Щелканов М.Ю., Алексеев В.В., Липницкий А.В., Антонов В.А., Джаркенов А.Ф. и др. Молекулярные маркеры патогенности вируса Западного Нила. *Вопросы вирусологии*. 2010; 55(1): 4–10.
6. Субботина Е.Л., Локтев В.Б. Молекулярная эволюция вируса Западного Нила. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2014; 29(1): 31–7.
7. Львов Д.К., ред. *Руководство по вирусологии: Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: МИА; 2013.
8. Топорков А.В., ред. *Лихорадка Западного Нила*. Волгоград: Волга-Пресс; 2017.
9. Платонов А.Е., Карань Л.С., Шопенская Т.А., Федорова М.В., Колясникова Н.М., Русакова Н.М. и др. Генотипирование штаммов вируса лихорадки Западного Нила, циркулирующих на юге России, как метод эпидемиологического расследования: принципы и результаты. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2011; 88(2): 29–37.
10. Львов Д.Н., Щелканов М.Ю., Джаркенов А.Ф., Галкина И.В., Колобухина Л.В., Аристова В.А. и др. Популяционные взаимодействия вируса Западного Нила (*Flaviviridae*, *Flavivirus*) с членистоногими переносчиками, позвоночными животными, людьми в среднем и нижнем поясах дельты Волги, 2001–2006 гг. *Вопросы вирусологии*. 2009; 54(2): 36–43.
11. Papa A., Bakonyi T., Xanthopoulou K., Vazquez A., Tenorio A., Nowotny N. Genetic characterization of West Nile virus lineage 2, Greece, 2010. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(5): 920–2. <https://doi.org/10.3201/eid1705.101759>
12. Kolodziejek J., Marinov M., Kiss BJ., Alexe V., Nowotny N. The complete sequence of a West Nile virus lineage 2 strain detected in a *Hyalomma marginatum marginatum* tick collected from a song thrush (*Turdus philomelos*) in Eastern Romania in 2013 revealed closest genetic relationship to strain Volgograd 2007. *PLoS One*. 2014; 9(10): e109905. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109905>
13. Rudolf I., Bakonyi T., Sebesta O., Mendel J., Pesko J., Betasova L., et al. West Nile virus lineage 2 isolated from *Culex modestus* mosquitoes in the Czech Republic, 2013: expansion of the European WNV endemic area to the North? *Euro Surveill*. 2014; 19(31): 2–5. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2014.19.31.20867>
14. Jungbauer C., Hourfar M.K., Stiasny K., Aberle S.W., Cadar D., Schmidt-Chanasit J., et al. West Nile virus lineage 2 infection in a blood donor from Vienna, Austria, August 2014. *J. Clin. Virol.* 2015; 64: 16–9. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.01.003>
15. Nagy A., Ban E., Nagy O., Ferenczi E., Farkas A., Banyai K., et al. Detection and sequencing of West Nile virus RNA from human urine and serum samples during the 2014 seasonal period. *Arch. Virol.* 2016; 161(7): 1797–806. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2844-5>
16. Baymakova M., Trifonova I., Panayotova E., Dakova S., Pacenti M., Barzon L., et al. Fatal case of West Nile neuroinvasive disease in Bulgaria. *Emerg. Infect. Dis.* 2016; 22(12): 2203–4. <https://doi.org/10.3201/eid2212.151968>
17. Ziegler U., Luhken R., Keller M., Cadar D., van der Grinten E., Michel F., et al. West Nile virus epizootic in Germany, 2018. *Antiviral. Res.* 2019; 162: 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.12.005>
18. Holicki C., Ziegler U., Raileanu C., Kampen H., Werner D., Schulz J., et al. West Nile virus lineage 2 vector competence of indigenous culex and aedes mosquitoes from Germany at temperate climate conditions. *Viruses*. 2020; 12(5): 561. <https://doi.org/10.3390/v12050561>
19. Busquets N., Laranjo-Gonzalez M., Soler M., Nicolas O., Rivas R., Talavera S., et al. Detection of West Nile virus lineage 2 in North-Eastern Spain (Catalonia). *Transbound. Emerg. Dis.* 2019; 66(2): 617–21. <https://doi.org/10.1111/tbed.13086>
20. Pacenti M., Sinigaglia A., Franchin E., Pagni S., Lavezzo E., Montarsi F., et al. Human West Nile virus lineage 2 infection: epidemiological, clinical, and virological findings. *Viruses*. 2020; 12(4): 458. <https://doi.org/10.3390/v12040458>
21. Veo C., Ventura C., Moreno A., Rovida F., Percivalle E., Canziani S., et al. Evolutionary dynamics of the lineage 2 West Nile virus that caused the largest European epidemic: Italy 2011–2018. *Viruses*. 2019; 11(9): 814. <https://doi.org/10.3390/v11090814>
22. Magurano F., Remoli M.E., Baggieri M., Fortuna C., Marchi A., Fiorentini C., et al. Circulation of West Nile virus lineage 1 and 2 during an outbreak in Italy. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012; 18(12): E545–7. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12018>

REFERENCES

1. L'vov D.K. West Nile fever. *Voprosy virusologii*. 2000; 45(2): 4–9. (in Russian)

2. Sejvar J. West Nile Virus Infection. *Microbiol Spectr.* 2016; 4(3): E110-0021-2016. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.E110-0021-2016>
3. Pachler K., Lebl K., Berer D., Rudolf I., Hubalek Z., Nowotny N. Putative new West Nile virus lineage in *Uranotaenia unguiculata* mosquitoes, Austria, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20(12): 2119–22. <https://doi.org/10.3201/eid2012.140921>
4. Zhukov K.V., Toporkov A.V., Viktorov D.V. Epidemiological aspects and modern evolution of globally spreading arboviruses. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2018; 95(6): 94–102. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-6-94-102> (in Russian)
5. Anishchenko M., Shchelkanov M.Yu., Alekseev V.V., Lipnitskiy A.V., Antonov V.A., Dzharhenov A.F., et al. Pathogenicity of West Nile virus: Molecular markers. *Voprosy virusologii.* 2010; 55(1): 4–10. (in Russian)
6. Subbotina E.L., Loktev V.B. Molecular evolution of the West Nile virus. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya.* 2014; 29(1): 34–41. (in Russian)
7. L'vov D.K., ed. *Virology Guidelines. Viruses and Viral Infections of Humans and Animals [Rukovodstvo po virusologii: Virusy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh]*. Moscow: MIA; 2013. (in Russian)
8. Toporkov A.V., ed. *West Nile Fever [Likhoradka Zapadnogo Nila]*. Volgograd: Volga-Press; 2017. (in Russian)
9. Platonov A.E., Karan' L.S., Shopenkaya T.A., Fedorova M.V., Kolyasnikova N.M., Rusakova N.M., et al. Genotyping of West Nile fever virus strains circulating in southern Russia as an epidemiological investigation method: principles and results. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2011; 88(2): 29–37. (in Russian)
10. L'vov D.N., Shchelkanov M.Yu., Dzharhenov A.F., Galkina I.V., Kolobukhina L.V., Aristova V.A., et al. Population interactions of West Nile virus (*Flaviviridae, Flavivirus*) with arthropod vectors, vertebrates, humans in the middle and low belts of Volga delta in 2001–2006. *Voprosy virusologii.* 2009; 54(2): 36–43. (in Russian)
11. Papa A., Bakonyi T., Xanthopoulou K., Vazquez A., Tenorio A., Nowotny N. Genetic characterization of West Nile virus lineage 2, Greece, 2010. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(5): 920–2. <https://doi.org/10.3201/eid1705.101759>
12. Kolodziejek J., Marinov M., Kiss B.J., Alexe V., Nowotny N. The complete sequence of a West Nile virus lineage 2 strain detected in a *Hyalomma marginatum marginatum* tick collected from a song thrush (*Turdus philomelos*) in Eastern Romania in 2013 revealed closest genetic relationship to strain Volgograd 2007. *PLoS One.* 2014; 9(10): e109905. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109905>
13. Rudolf I., Bakonyi T., Sebesta O., Mendel J., Pesko J., Betasova L., et al. West Nile virus lineage 2 isolated from *Culex modestus* mosquitoes in the Czech Republic, 2013: expansion of the European WNV endemic area to the North? *Euro Surveill.* 2014; 19(31): 2–5. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2014.19.31.20867>
14. Jungbauer C., Hourfar M.K., Stiasny K., Aberle S.W., Cadar D., Schmidt-Chanasit J., et al. West Nile virus lineage 2 infection in a blood donor from Vienna, Austria, August 2014. *J. Clin. Virol.* 2015; 64: 16–9. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.01.003>
15. Nagy A., Ban E., Nagy O., Ferenczi E., Farkas A., Banyai K., et al. Detection and sequencing of West Nile virus RNA from human urine and serum samples during the 2014 seasonal period. *Arch. Virol.* 2016; 161(7): 1797–806. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2844-5>
16. Baymakova M., Trifonova I., Panayotova E., Dakova S., Pacenti M., Barzon L., et al. Fatal case of West Nile neuroinvasive disease in Bulgaria. *Emerg. Infect. Dis.* 2016; 22(12): 2203–4. <https://doi.org/10.3201/eid2212.151968>
17. Ziegler U., Luhken R., Keller M., Cadar D., van der Grinten E., Michel F., et al. West Nile virus epizootic in Germany, 2018. *Antiviral Res.* 2019; 162: 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.12.005>
18. Holicki C., Ziegler U., Raileanu C., Kampen H., Werner D., Schulz J., et al. West Nile virus lineage 2 vector competence of indigenous culex and aedes mosquitoes from Germany at temperate climate conditions. *Viruses.* 2020; 12(5): 561. <https://doi.org/10.3390/v12050561>
19. Busquets N., Laranjo-Gonzalez M., Soler M., Nicolas O., Rivas R., Talavera S., et al. Detection of West Nile virus lineage 2 in North-Eastern Spain (Catalonia). *Transbound. Emerg. Dis.* 2019; 66(2): 617–21. <https://doi.org/10.1111/tbed.13086>
20. Pacenti M., Sinigaglia A., Franchin E., Pagni S., Lavezzo E., Montarsi F., et al. Human West Nile virus lineage 2 infection: epidemiological, clinical, and virological findings. *Viruses.* 2020; 12(4): 458. <https://doi.org/10.3390/v12040458>
21. Veo C., Ventura C., Moreno A., Rovida F., Percivalle E., Canziani S., et al. Evolutionary dynamics of the lineage 2 West Nile virus that caused the largest European epidemic: Italy 2011–2018. *Viruses.* 2019; 11(9): 814. <https://doi.org/10.3390/v11090814>
22. Magurano F., Remoli M.E., Baggieri M., Fortuna C., Marchi A., Fiorentini C., et al. Circulation of West Nile virus lineage 1 and 2 during an outbreak in Italy. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012; 18(12): E545–7. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12018>

Информация об авторах

Батулин Артем Александрович — н.с. лаб. генодиагностики Волгоградского НИПЧИ Роспотребнадзора, Волгоград, Россия, chemistry1987@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9510-7246>

Ткаченко Галина Александровна — к.м.н., в.н.с. лаб. генодиагностики Волгоградского НИПЧИ Роспотребнадзора, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0199-3342>

Леденева Маргарита Леонтьевна — н.с. лаб. генодиагностики Волгоградского НИПЧИ Роспотребнадзора, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5923-4774>

Лемасова Людмила Викторовна — к.м.н., с.н.с. лаб. генодиагностики Волгоградского НИПЧИ Роспотребнадзора, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3256-5025>

Бондарева Ольга Сергеевна — к.м.н., н.с. лаб. генодиагностики Волгоградского НИПЧИ Роспотребнадзора, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5690-6686>

Information about the authors

Artem A. Baturin — researcher, Laboratory of genodiagnostics, Volgograd Research Institute for Plague Control, Volgograd, Russia, chemistry1987@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9510-7246>

Galina A. Tkachenko — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of genodiagnostics, Volgograd Research Institute for Plague Control, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0199-3342>

Margarita L. Ledeneva — researcher, Laboratory of genodiagnostics, Volgograd Research Institute for Plague Control, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5923-4774>

Ludmila V. Lemasova — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of genodiagnostics, Volgograd Research Institute for Plague Control, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3256-5025>

Ol'ga S. Bondareva — Cand. Sci. (Med.), researcher, Laboratory of genodiagnostics, Volgograd Research Institute for Plague Control, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5690-6686>

Кайсаров Илья Дмитриевич — н.с. лаб. генодиагностики Волгоградского НИПЧИ Роспотребнадзора, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5578-3343>

Шпак Иван Михайлович — к.м.н., н.с. сектора биоинформационного анализа Волгоградского НИПЧИ Роспотребнадзора, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6446-0274>

Бородай Наталья Владимировна — с.н.с. сектора эпизоотологического мониторинга Волгоградского НИПЧИ Роспотребнадзора, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2076-5276>

Король Екатерина Васильевна — н.с. лаб. оперативной диагностики бактериальных и вирусных инфекций Волгоградского НИПЧИ Роспотребнадзора, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8691-1408>

Тетерятникова Наталья Николаевна — н.с. лаб. патогенных буркхольдерий Волгоградского НИПЧИ Роспотребнадзора, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8928-2152>

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

Статья поступила в редакцию 09.09.2020;
принята к публикации 02.03.2021;
опубликована 20.05.2021

Ilya D. Kaysarov — researcher, Laboratory of genodiagnostics, Volgograd Research Institute for Plague Control, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5578-3343>

Ivan M. Shpak — Cand. Sci. (Med.), researcher, Sector of bioinformatics analysis, Volgograd Research Institute for Plague Control, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6446-0274>

Natal'ya V. Boroday — senior researcher, Sector of epizootic monitoring, Volgograd Research Institute for Plague Control, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2076-5276>

Ekaterina V. Korol' — researcher, Laboratory of operative diagnostics of bacterial and viral infections, Volgograd Research Institute for Plague Control, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8691-1408>

Natal'ya N. Teteryatnikova — researcher, Laboratory of pathogenic burkholderia, Volgograd Research Institute for Plague Control, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8928-2152>

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.

The article was submitted 09.09.2020;
accepted for publication 02.03.2021;
published 20.05.2021

ОБЗОРЫ

Научный обзор

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-112>



Систематический обзор вспышек гемоконтактных инфекций (гепатит В, С, ВИЧ), передающихся от пациента к пациенту при оказании медицинской помощи

Сацук А.В.^{1,2}✉, Солопова Г.Г.¹, Плоскирева А.А.²

¹Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева, Москва, Россия;

²Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Аннотация

Медицинские учреждения всегда имели значение в передаче гемоконтактных инфекций. Манипуляции, сопровождающиеся образованием крови, представляют опасность в распространении гепатитов В, С и ВИЧ не только для персонала, но и для пациентов.

С целью оценки значения медицинских учреждений в передаче гемоконтактных инфекций, выявления групп риска среди пациентов и факторов передачи проанализировано 75 вспышек гепатита В, С и ВИЧ, данные о которых опубликованы в разных странах в 2008–2020 гг. Проведено сравнение вспышек в США в течение 1992–2008 и 2008–2019 гг.

Основной причиной вспышек гемоконтактных инфекций в медицинских учреждениях является несоблюдение медицинским персоналом стандартных профилактических мер: повторное использование изделий однократного применения; отсутствие обработки рук; повторное применение перчаток; отсутствие дезинфекции поверхностей, многоразовых приборов и устройств; отсутствие стерилизации многоразовых инструментов. К учреждениям высокого риска в отношении заражения гемоконтактными инфекциями относятся учреждения, проводящие гемодиализ, онкогематологические, амбулаторные учреждения, дома престарелых, интернаты, клиники, где проходят лечение пациенты с сахарным диабетом. Контингентом высокого риска являются пациенты, получающие гемодиализ, онкогематологические пациенты и пациенты с сахарным диабетом.

Диагностика гемоконтактных инфекций на регулярной основе, вакцинация против гепатита В среди пациентов высокого риска, расследование вспышек, внедрение регламентов работы в сочетании с обучением и контролем приверженности персонала являются решением проблемы нозокомиальной передачи гемоконтактных инфекций.

Ключевые слова: обзор, нозокомиальная вспышка; вспышка, связанная с оказанием медицинской помощи; гемоконтактные инфекции, гепатит В, гепатит С, ВИЧ

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

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

Для цитирования: Сацук А.В., Солопова Г.Г., Плоскирева А.А. Систематический обзор вспышек гемоконтактных инфекций (гепатит В, С, ВИЧ), передающихся от пациента к пациенту при оказании медицинской помощи. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(3):319–330.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-112>

Review article
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-112>

A systematic review of outbreaks of bloodborne infections (hepatitis B and C, HIV) transmitted from patient to patient in healthcare settings

Anastasija V. Sacuk^{1,2}✉, Galina G. Solopova¹, Antonina A. Ploskireva²

¹Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russia;

²Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Abstract

Healthcare facilities have always played an important role in transmission of bloodborne infections. Procedures involving blood and blood fluids pose a risk of transmitting hepatitis B, hepatitis C and HIV not only to healthcare workers, but also to patients.

To assess the role of healthcare facilities in transmission of bloodborne infections and to identify risk groups among patients as well as transmission factors, a total of 75 outbreaks of hepatitis B, hepatitis C and HIV have been analyzed with reference to the data published in different countries in 2008–2020. The comparative analysis was conducted for the outbreaks in the United States during 1992–2008 and 2008–2019.

Most of the outbreaks of bloodborne infections at healthcare facilities were caused by non-adherence to standard precautions among healthcare workers: Reusing disposable items; improper handwashing; reusing gloves; non-disinfecting surfaces, reusable equipment and devices; non-sterilizing reusable instruments. In terms of bloodborne infections, high-risk facilities include hemodialysis centers, oncohematology clinics, outpatient clinics, nursing homes, residential care facilities, and diabetes treatment centers. High-risk groups include patients undergoing hemodialysis, oncohematological patients, and patients with diabetes.

Diagnosis of bloodborne infections on a regular basis, hepatitis B vaccination among high-risk patients, investigation of outbreaks, adoption of rules and procedures combined with training and compliance control of healthcare workers contribute to solution of the problem associated with nosocomial transmission of bloodborne infections.

Keywords: review, nosocomial outbreak; healthcare-associated outbreak; bloodborne infections, hepatitis B, hepatitis C, HIV

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

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

For citation: Sacuk A.V., Solopova G.G., Ploskireva A.A. A systematic review of outbreaks of bloodborne infections (hepatitis B and C, HIV) transmitted from patient to patient in healthcare settings. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(3):319–330.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-112>

Введение

Гемоконтактные инфекции всегда имели большой потенциал передачи в учреждениях, оказывающих медицинскую помощь, как среди медицинских работников, так и среди пациентов. Гемоконтактные инфекции характеризуются длительным инкубационным периодом (до 6 мес), отсутствием симптомов или наличием лёгких, неспецифических клинических проявлений. Инфекции могут оставаться невыявленными в течение многих лет, а пациенты могут иметь множественные обращения за медицинской помощью, становясь источником нозокомиальной инфекции.

Большинство вспышек, связанных с оказанием медицинской помощи, до 1990-х гг. рассматривались со стороны небезопасности гемотрансфузий, но с введением ряда мер в отношении безопасности компонентов крови был достигнут существенный

успех в предотвращении распространения гемоконтактных инфекций при переливании крови [1]. Благодаря внедрению высокочувствительных диагностических систем, карантинизации плазмы и охвату обследованием доноров значение гемотрансфузий в передаче гемоконтактных инфекций существенно снизилось за последние десятилетия. Однако в странах с низкими ресурсами проблема сохранения ввиду отсутствия возможности полностью обследовать всех доноров. Согласно отчёту ВОЗ, в странах с высоким уровнем доходов обследуется 99,6% доноров, в странах с низким уровнем доходов — 66%¹. В США последняя вспышка гепатита В при переливании крови описана в 1997 г. В 1995 г.

¹ World Health Organization, Global status report on blood safety and availability 2016. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254987/9789241565431-eng.pdf?sequence=1>

в США была опубликована информация о вспышке гепатита В при переливании аутологичных гемопоэтических стволовых клеток, при этом заражение произошло вследствие контаминации жидкого азота из порванного пакета инфицированных клеток задолго до случая инфицирования [2].

С уходом значения гемотрансфузий на задний план проблема передачи гемоконтактных инфекций в медицинских учреждениях осталась нерешённой, кроме того, открылась роль небезопасных инъекций и манипуляций. В исследовании «Global Burden of Disease» в 2000 г. выявили, что в 10 из 14 наиболее поражённых регионов 39% инъекций проводились с инъекционным оборудованием, которое было повторно использовано без стерилизации. В исследовании смоделировали реальную ситуацию заражения инфекциями во время инъекций, учитывая риски заражения при инъекциях, долю небезопасных инъекций, поражённость населения, иммунитет и т.д. В результате моделирования предположили, что в 2000 г. небезопасные инъекции стали причиной примерно 21 млн случаев инфицирования вирусом гепатита В, 2 млн случаев инфицирования вирусом гепатита С и 260 тыс. случаев инфицирования ВИЧ, что составило 32, 40 и 5% соответственно от числа новых случаев инфекций [3]. С 2000 г. были предприняты значительные усилия ВОЗ под руководством Safe Injection Global Network по снижению рисков, связанных с небезопасными инъекциями. В 2000–2010 гг. в 81% стран снизилось количество небезопасных инъекций, при этом повторное использование инъекционного оборудования уменьшилось с 39,8 до 5,5%. В 2015 г. инъекции стали безопасными в 97% случаях [4]. Введение вакцинации против гепатита В во многом разрешило проблему нозокомиальной передачи гепатита В, однако в силу низкого охвата вакцинацией в развивающихся странах и присутствия непривитых среди старших возрастных групп в развитых странах нозокомиальные вспышки гепатита В продолжают регистрироваться [2].

Отделения гемодиализа исторически характеризовались высоким риском заражения гемоконтактными инфекциями как пациентов, так и персонала [5]. За последние десятилетия в этой области достигнут успех: снижение заболеваемости гепатитом В и С [6–8]. В силу отсутствия возможности вакцинировать от гепатита В находящихся на гемодиализе пациентов, охват вакцинацией данного контингента в США составляет 56%. Поражённость в поствакцинальный период составила 1% [9]. Поражённость гепатитом С получающих гемодиализ пациентов составляет 8% и превышает поражённость населения примерно в 5 раз. Поражённость пациентов и продолжающиеся вспышки в данных учреждениях демонстрируют значение гемодиализа в передаче гемоконтактных инфекций [10].

Пациенты онкогематологического профиля всегда рассматривались как группа высокого риска в отношении заражения гемоконтактными инфекциями, ассоциирующаяся с многочисленными гемотрансфузиями и трансплантацией костного мозга [11]. В доскрининговый период, когда обследование доноров не проводилось, поражённость пациентов гепатитом В в Польше до 1992 г. достигала 62%, гепатитом С до 2000 г. — 54,3%. С введением обследования доноров, в 1999–2000 гг., поражённость пациентов гепатитом В составила 1,9%, гепатитом С — 2,8% [12]. Серопревалентность пациентов онкогематологического профиля зависит от охвата обследованием доноров и поражённости населения. Например, в Египте серопревалентность anti-HCV у детей с гематологическими заболеваниями составляет 81,6%, у детей с онкологическими заболеваниями — 17,6%, HBV-DNA — 38% [13]. В Бразилии серопревалентность HBV онкологических пациентов составила 13,97% [14]. В Турции серопревалентность HBsAg онкологических пациентов составила 4,2%, anti-HCV — 0,7% [15]. В США серопревалентность HBV — 6,5%, HCV — 2,4%, HIV — 1,1% [16]. Кроме того, пациенты онкогематологического профиля имеют более высокий уровень смертности при инфицировании вирусным гепатитом, чем общая популяция, поскольку химиотерапия усиливает репликацию вируса и развитие фульминантного гепатита [2].

При пересадке органов упоминание о передаче гемоконтактных инфекций в литературе встречается редко. В США имеется описание 2 вспышек гепатита С, связанных с пересадкой органов [17].

Передача каждой инфекции при оказании медицинской помощи имеет разное значение. Как инфекция, управляемая специфической иммунопрофилактикой, гепатит В имеет значение среди непривитых контингентов. Гепатит С, напротив, в силу отсутствия специфической иммунопрофилактики имеет высокое значение среди всех контингентов, и проблема нозокомиальной передачи не решена даже в развитых странах. Гетерогенное распространение гепатита С среди регионов и внутри региона является маркёром активной реализации артификального механизма передачи в медицинских учреждениях, как и внутривенного употребления наркотиков². Место артификального механизма передачи гепатита С при медицинских манипуляциях сильно варьирует в различных странах и зависит от поражённости населения. Чем выше поражённость населения, тем выше значение артификального механизма. При этом преобладание людей старшего возраста и лиц всех возрастов

² World Health Organization 2017. Global Hepatitis Report 2017. Geneva. Available at: <https://www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017/en>

в структуре поражённости населения гепатитом С указывает на активно реализующийся искусственный механизм передачи при медицинских манипуляциях [18, 19].

Несмотря на достигнутый успех, в медицинских учреждениях сохраняется риск заражения гемоконтактными инфекциями, при этом в некоторых сферах он имеет тенденцию к росту, что связано с увеличением количества инвазивных вмешательств и поражённостью населения гепатитом С и ВИЧ.

Целью систематического обзора являются оценка значения медицинских учреждений в передаче гемоконтактных инфекций, выявление групп риска среди пациентов и причин заражения гепатитами В, С и ВИЧ-инфекцией.

Проанализированы публикации о внутрибольничных вспышках гемоконтактных инфекций (гепатита В, С и ВИЧ) на следующих информационных ресурсах: PubMed, Outbreak Database, ClinicalKey, NCBI, EBSCOhost, Web of Science, Cambridge University Press, ResearchGate, eLibrary. Анализ вспышек в США проводился на основании отчёта Centers for Disease Control and Prevention [20].

Данные о вспышках гемоконтактных инфекций в мире

Для анализа были отобраны публикации вспышек, зарегистрированных в разных странах, с датой начала вспышки в период с 2008 г. по ноябрь 2020 г. В анализ включены вспышки, передача инфекции при которых осуществлялась от пациента к пациенту, с количеством случаев 2 и более, имеющих эпидемиологическую и генетическую связь. Вспышки в учреждениях гемодиализа, онкогематологии, длительного пребывания пациентов были проанализированы отдельно как профили наибольшего риска. В **табл. 1–3** представлены перечень вспышек, причины и факторы их возникновения.

Поскольку наиболее полно картина вспышек представлена в США, проведено сравнение результатов анализа вспышек двух периодов, зарегистрированных в США, а именно данных, полученных в настоящем обзоре (в 2008–2020 гг.), и данных анализа вспышек в 1998–2008 гг. [21]. Сравнение проводилось по вспышкам в негоспитальных учреждениях, поскольку в 2008–2020 гг. в США вспышек в стационарах (госпиталях) при передаче инфекций от пациента к пациенту зарегистрировано не было.

Всего проанализировано 75 вспышек (1100 случаев заражения), отвечающих критериям отбора (табл. 2). Отчёт о вспышках в США включал описание 60 вспышек (428 случаев заражения), в том числе с количеством вспышек гепатита В — 22 (181 случай), гепатита С — 36 (233 случая), гепатита В и С — 2 вспышки (гепатит В — 5, гепатит С — 9 случаев) [20].

Данные о вспышках гемоконтактных инфекций в России

В России описаний вспышек, удовлетворяющих критериям, не обнаружено. Однако проблема внутрибольничной передачи гемоконтактных инфекций в России является актуальной. Так, в 2019 г. завершено расследование очага с множественными ретроспективно выявленными случаями заболевания гепатитом С в отделении гематологии медицинской организации в Амурской области³. Несмотря на отсутствие сведений о внутрибольничных вспышках, по данным управлений Роспотребнадзора в субъектах РФ, с 2010 по 2019 г. отмечается большая доля случаев гепатита С с неустановленными путями передачи возбудителя (54,7%), что свидетельствует о недостаточно эффективном эпидемиологическом расследовании очагов. Согласно данным Федерального научно-методического центра по профилактике и борьбе со СПИДом, с 1987 по 2019 г. в России было зарегистрировано 463 подтверждённых случая ВИЧ-инфекции, связанной с оказанием медицинской помощи, среди пациентов медицинских организаций, включая 103 случая инфицирования при переливании крови и её компонентов и 3 случая передачи ВИЧ при трансплантации органов. В 2019 г. было сообщено о 9 случаях с подозрением на заражение в медицинских организациях при использовании нестерильного медицинского инструментария, об одном случае инфицирования реципиента при переливании тромбоцитарной массы от донора крови.

Среди проанализированных вспышек наибольшее количество (25) зарегистрировано в прочих учреждениях, среди них преобладают амбулаторные учреждения (17 вспышек). В учреждениях, проводящих гемодиализ, выявлено 24 вспышки. В учреждениях длительного пребывания пациентов, к которым относятся интернаты, организации, осуществляющие уход на дому, дома престарелых, зафиксировано 21 вспышка. В учреждениях онкогематологического профиля зарегистрированы 5 вспышек.

Наибольшее количество случаев инфицирования произошло в прочих учреждениях — 596 случаев, в учреждениях длительного пребывания пациентов — 184, в учреждениях, проводящих гемодиализ, — 173, в учреждениях онкогематологического профиля — 147 случаев.

Причины заражения

Прочие учреждения (в том числе амбулаторные)

Основной причиной вспышек в прочих учреждениях являлись контаминированные флаконы

³ Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2019 году». https://www.rosпотребнадзор.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=14933

Таблица 1. Перечень вспышек гемоконтактных инфекций (гепатиты В, С, ВИЧ), связанных с оказанием медицинской помощи, зарегистрированных в разных странах в 2008–2020 гг.

Table 1. The list of outbreaks of healthcare-associated bloodborne infections (hepatitis B, hepatitis C, and HIV) recorded in different countries in 2008–2020

Страна, источник Country, source	Профиль медицинского учреждения Type of a healthcare facility	Всего вспышек Total outbreaks	Период вспышки Outbreak period	Количество случаев Number of cases	Инфекция Infection	Причины заражения Causes of infection
Учреждения гемодиализа Hemodialysis centers						
Голландия Holland [22]	Гемодиализ Hemodialysis	1	2016	2	Гепатит С Hepatitis C	Аппарат гемодиализа (порт измерения давления) Hemodialysis apparatus (the pressure measurement port)
Вьетнам Vietnam [23]	Гемодиализ Hemodialysis	1	2013	11	Гепатит С Hepatitis C	Аппарат гемодиализа. Разграничение зон Hemodialysis apparatus Area delineation
США USA [20]	Гемодиализ (амбулаторный) Hemodialysis (outpatient)	21	2008–2018	104	Гепатит С Hepatitis C	См. табл. 2 See Table 2
Пакистан Pakistan [24]	Гемодиализ Hemodialysis	1	2016	56	ВИЧ HIV	Аппараты гемодиализа, применение компонентов крови из несанкционированных лабораторий и банков Hemodialysis apparatus, using blood components from unauthorized laboratories and blood banks
Всего Total			Гепатит С — 117 случаев, ВИЧ — 56, всего вспышек — 24 Hepatitis C — 117, HIV — 56, total outbreaks — 24			
Учреждения онкогематологического профиля Oncohematology clinics						
Венгрия Hungary [25]	Онкология Oncology	1	2007–2008	20	Гепатит С Hepatitis C	Нет данных No data available
Южная Африка South Africa [26]	Детская гематология, онкология Pediatric hematology, oncology	1	2011–2013	49	Гепатит В Hepatitis B	Множественные нарушения. Отсутствие вакцинации Multiple violations. Absence of vaccination
Словакия Slovakia [27]	Онкология Oncology	1	2010–2011	22	Гепатит В Hepatitis B	Разграничение зон. Повторное использование заглушек. Обработка рук. Обращение с отходами Area delineation. Reuse of plugs. Handwashing. Waste management
				9	Гепатит С Hepatitis C	
				8	Гепатит В и С Hepatitis B and C	
США (Мичиган) USA (Michigan) [20]	Гематология, онкология Hematology, Oncology	1	2012	10	Гепатит С Hepatitis C	Не определён Unidentified
США (Нью Джерси) USA (New Jersey) [20, 28]	Онкология (амбулаторная) Oncology (outpatient)	1	2009	29	Гепатит В Hepatitis B	Флакон NaCl. Однодозовые флаконы. Разграничение зон NaCl vial. Single-dose vials. Area delineation
Всего Total			Гепатит С — 39, гепатит В — 100, гепатит В и С — 8, вспышек — 5 Hepatitis C — 39, hepatitis B — 100, hepatitis B and C — 8, outbreaks — 5			

Окончание табл. 1 / End of Table 1

Страна, источник Country, source	Профиль медицинского учреждения Type of a healthcare facility	Всего вспышек Total outbreaks	Период вспышки Outbreak period	Количество случаев Number of cases	Инфекция Infection	Причины заражения Causes of infection
Учреждения длительного пребывания пациентов Long-term care facilities						
США USA [20]	Интернаты, учреждения ухода на дому, дома престарелых Home care facilities, nursing homes	20	2008–2016	133	Гепатит В Hepatitis B	См. табл. 2 See Table 2
				46	Гепатит С Hepatitis C	
Германия Germany [29]	Дом престарелых Nursing home	1	2010	5	Гепатит В Hepatitis B	Ланцет для взятия капиллярной крови при глюкометрии Blood lancet for capillary blood sampling for blood glucose measurement
Всего Total			Гепатит С — 46, гепатит В — 138, вспышек — 21 Hepatitis C — 46, hepatitis B — 138, outbreaks — 21			
Прочие учреждения Other facilities						
Швейцария Switzerland [30]	Радиология (КТ) Radiology (CT)	1	2013	4	Гепатит С Hepatitis C	Флакон NaCl NaCl vial
Израиль Israel [31]	Радиология (КТ) Radiology (CT)	1	2018	12	Гепатит С Hepatitis C	Внутривенный контраст Intravenous contrast media
Германия Germany [32]	Ортопедическое отделение Orthopedic department	1	2009	5	Гепатит С Hepatitis C	Не известен Unknown
Китай China [33]	Гинекология, акушерство Gynecology, obstetrics	1	2016–2017	5	ВИЧ HIV	Линии для сбора и обработки лимфоцитов Lines for lymphocyte collection and processing
Китай (Гонконг) China (Hong Kong) [34]	Трансплантация печени Liver transplantation	1	2018	–	Гепатит С Hepatitis C	Держатель пробирок для взятия крови Blood tube holder
США USA [20]	Амбулаторные учреждения Outpatient facilities	17	2008–2019	14	Гепатит В Hepatitis B	См. табл. 2 See Table 2
				73	Гепатит С Hepatitis C	
	Стоматология Dentistry	1	2009	5	Гепатит В Hepatitis B	Множественные нарушения Multiple violations
Пакистан Pakistan [35, 36]	Педиатрия Pediatrics	1	2019	453	ВИЧ + гепатит В + гепатит С HIV + hepatitis C + hepatitis B	404 пациента — инъекции 404 patients — injections
				48		40 пациентов — переливание крови 40 patients — blood transfusion
				15		49 пациентов — инъекции (повторное использование игл) + переливание крови 49 patients — injections (reused needles) + blood transfusion
Индия India [37]	Госпиталь Hospital	1	2009	25	Гепатит В Hepatitis B	Инъекции (повторное использование шприцев и игл) Injections (reuse of syringes and needles)
Всего Total			Гепатит С — 94, гепатит В — 44, ВИЧ — 395, ВИЧ + гепатит С — 15, ВИЧ + гепатит В — 48, всего вспышек — 25 Hepatitis C — 94, hepatitis B — 44, HIV — 395, HIV + hepatitis C — 15, HIV + hepatitis B — 48, total outbreaks — 25			

Таблица 2. Суммарное количество вспышек и случаев гемоконтактных инфекций в зависимости от профиля учреждения, зарегистрированных в разных странах в 2008–2020 гг.

Table 2. The total number of outbreaks and cases of bloodborne infections depending on the type of a facility; data on different countries in 2008–2020

Учреждения Facilities	Гепатит С Hepatitis C	Гепатит В Hepatitis B	Гепатит В + гепатит С Hepatitis B + hepatitis C	ВИЧ HIV	ВИЧ + гепатит С HIV + hepatitis C	ВИЧ + гепатит В HIV + hepatitis B	Вспышки, всего Total outbreaks	Случаи, всего Total cases
Гемодиализ Hemodialysis	117	–	–	56	–	–	24	173
Онкогематология Oncohematology	39	100	8	–	–	–	5	147
Учреждения длительного пребывания Long-term care facilities	46	138	–	–	–	–	21	184
Прочие Other	94	44	–	395	15	48	25	596
Итого Total	296	282	8	451	15	48	75	1100

Таблица 3. Причины гемоконтактных инфекций во время вспышек в США в 2008–2020 гг.

Table 3. Causes of bloodborne infections during outbreaks in the United States in 2008–2020

Профиль учреждения Type of a facility	Причина, фактор передачи / Cause, transmission factor								
	дезин- фекция disinfection	гигиена рук hand hygiene	измерение глюкозы glucose measuring	контамини- рованные флаконы contaminated vials	взятие капилляр- ной крови capillary blood sampling	1-дозовые флаконы single-dose vials	разгра- ничение зон area deli- neation	подиат- рический уход podiatric care	уход за вну- тривенным катетером intravenous catheter care
Учреждения длительного пребывания Long-term care facilities	–	3	12	–	6	–	–	4	–
Амбулаторные учреждения Outpatient clinics	1	–	1	10	–	5	1	–	–
Учреждения гемодиализа Hemodialysis	13	10	–	–	–	1	4	–	4
Всего Total	14	13	13	10	6	6	5	4	4

медикаментов (в 12 вспышках). Контаминация флаконов происходит во время набора препарата использованным шприцем. Флаконы следующих препаратов являлись причиной вспышек: физиологический раствор, контрастное вещество, препараты для наркоза и анестезии (пропофол, кетамин, маркаин, лидокаин и т.д.) — в 12 вспышках. Многократное использование однодозовых флаконов имело место в 5 вспышках. Во время вспышек в Пакистане и Индии причинами стали инъекции (2 вспышки), а именно повторное использование шприцев и игл. В Пакистане также имело значение переливание крови. Во время вспышки ВИЧ в Китае причиной стала линия для сбора и обработки лимфоцитов при лимфоцитоиммунотерапии, применяемой для лече-

ния бесплодия. В Гонконге описана вспышка, причиной которой стал контаминированный держатель вакуумных пробирок для взятия крови.

Учреждения гемодиализа

Среди причин инфицирования гемоконтактными инфекциями в отделениях гемодиализа наиболее часто встречается отсутствие дезинфекции поверхностей (в 14 вспышках): рабочих поверхностей, кресел и подлокотников, аппарата гемодиализа и поверхностей, окружающих его. В 10 вспышках упомянуты нарушения в области гигиены рук: обработка рук и использование перчаток. В 4 вспышках среди причин было отсутствие разграничения зон, где готовятся инфузии («чистая»

зона), проводятся работа с образцами крови («грязная» зона) и работа с пациентом («лечебная» зона), ещё в 4 вспышках — уход за внутривенным катетером, который включает в себя рутинное промывание и смену повязки. Причинами вспышки в Пакистане являлись отсутствие персонала, отсутствие разграничения аппаратов для инфицированных и неинфицированных пациентов и приобретение пациентами компонентов крови в несанкционированных лабораториях и банках.

Учреждения длительного пребывания пациентов

Причины возникновения вспышек в учреждениях длительного пребывания пациентов (интернаты, дома престарелых, учреждения, осуществляющие уход на дому) в Германии и США определяет контингент пациентов данных учреждений. Самая распространённая причина — измерение глюкозы, а именно контаминация глюкометров, которые при использовании не являлись индивидуальными и не обеззараживались между пациентами (в 12 вспышках). Многократное использование ланцета для прокалывания кожи при взятии капиллярной крови на анализ, в том числе для глюкометрии, имело значение в 7 вспышках. Применение инструментов, не прошедших стерилизацию, использованных при подиатрическом уходе за диабетической стопой, имело значение в 4 вспышках. Нарушения в области гигиены рук упомянуты в 4 вспышках.

Учреждения онкогематологического профиля

Причины возникновения вспышек в учреждениях онкогематологического профиля включали множественные нарушения, относящиеся к стандартным профилактическим мерам: разграничение «чистых» и «грязных» зон, повторное использование заглушек, нарушения в области гигиены рук, неправильное обращение с отходами, контаминированные флаконы физиологического раствора для промывания внутривенного катетера, многократное использование однодозовых флаконов. В Южной Африке причиной возникновения вспышки стало отсутствие вакцинации детей в сочетании с множественными нарушениями стандартных профилактических мер.

Сравнение данных обзоров о вспышках в США

Характеристика вспышек в США двух периодов: 1998–2008 и 2008—2019 гг. представлена в табл. 4.

При сравнении данных двух периодов можно отметить, что увеличилось число вспышек, но количество случаев заражения не изменилось.

В амбулаторных учреждениях сократилась передача гепатита С, но значение контаминированных флаконов остаётся актуальным. Столь высокое значение амбулаторных учреждений в распространении инфекций в США связано с тем, что большая часть медицинской помощи оказывается в них в том числе пациентам онкогематологического профиля и нуждающимся в гемодиализе.

Значительно увеличилась передача гемоконтактных инфекций в учреждениях гемодиализа. При этом в 2008–2019 гг. контаминированные флаконы, являющиеся основным фактором в 1992–2008 гг., значения не имели. В позднем периоде на первый план вышли контаминированные поверхности и низкая приверженность к обработке рук.

В учреждениях длительного пребывания пациентов увеличилось число заражений, и проблема взятия капиллярной крови и глюкометрии остаётся актуальной.

Таким образом, актуальные в прошлые десятилетия факторы в настоящее время продолжают быть причиной нозокомиального распространения гемоконтактных инфекций, при этом значение некоторых из них растёт.

Выводы

Гетерогенность вспышек гемоконтактных инфекций в разных медицинских учреждениях связана с нозологией основных заболеваний пациентов. Больше всего вспышек происходит в учреждениях, где проходят лечение пациенты со сниженным иммунитетом, имеющие терминальную стадию почечного заболевания, сахарный диабет, онкологические заболевания [2].

Пациенты онкогематологического профиля, пациенты, получающие гемодиализ, и пациенты учреждений длительного пребывания (интернаты, организации, осуществляющие уход на дому, дома престарелых) являются контингентами высокого риска заражения гемоконтактными инфекциями при получении медицинской помощи. Пациенты онкогематологического профиля и пациенты, получающие гемодиализ, помимо иммуносупрессивного состояния, имеют дополнительный фактор риска — венозный катетер. При работе с венозным катетером образуются мелкие капли крови. В исследованиях показано, что на визуально чистых поверхностях в окружении пациента, инфицированного гепатитом В, после манипуляций с катетером или процедуры гемодиализа присутствует вирус гепатита В [38, 39]. Значение профилактики гемоконтактных инфекций среди пациентов учреждений длительного ухода растёт, поскольку наблюдается увеличение количества людей старшего и преклонного возраста в развитых странах. Кроме того, вспышки гепатита В в данных учреждениях нередко сопровождаются летальными исходами [21].

Таблица 4. Сравнение данных обзоров вспышек гемоконтактных инфекций в негоспитальных учреждениях США в 1998–2008 [21] и 2008–2019 гг.

Table 4. Comparison of the review data on outbreaks of bloodborne infections in non-hospital facilities in the United States in 1998–2008 [21] and 2008–2019

Показатель Parameter	1998–2008 гг. (11 лет) 1998–2008 (11 years)	2008–2019 гг. (12 лет) 2008–2019 (12 years)
Прочие учреждения Other facilities		
Вспышки / Outbreaks		
гепатит В / hepatitis B	18	22
гепатит С / hepatitis C	16	36
гепатит В + гепатит С hepatitis B + hepatitis C	–	2
Случаи / Cases		
гепатит В / hepatitis B	173	186
гепатит С / hepatitis C	274	242
гепатит В + гепатит С hepatitis B + hepatitis C	1	–
Амбулаторные учреждения Outpatient clinics		
Вспышки / Outbreaks		
	12	19 (в том числе в онкогематологических учреждениях) (including oncohematology clinics)
Случаи / Cases		
гепатит В / hepatitis B	76	43
гепатит С / hepatitis C	235	83
гепатит В + гепатит С hepatitis B + hepatitis C	–	–
Основной фактор передачи Main transmission factor	Контаминированные флаконы Contaminated vials	Контаминированные флаконы Contaminated vials
Учреждения гемодиализа Hemodialysis centers		
Вспышки / Outbreaks		
	6	22
Случаи / Cases		
гепатит В / hepatitis B	–	29
гепатит С / hepatitis C	40	104
гепатит В + гепатит С hepatitis B + hepatitis C	–	–
Основной фактор передачи Main transmission factor	Контаминированные флаконы Contaminated vials	Контаминированные поверхности Contaminated surfaces
Учреждения длительного пребывания пациентов Long-term care facilities		
Вспышки / Outbreaks		
	15	20
Случаи / Cases		
гепатит В / hepatitis B	97	133
гепатит С / hepatitis C	–	46
гепатит В + гепатит С hepatitis B + hepatitis C	–	–
Основной фактор передачи Main transmission factor	Многоразовое использование ланцета Reuse of lancet	Контаминированные глюкометры Contaminated glucometers

Основными причинами передачи ВИЧ, гепатита В и С в настоящее время является несоблюдение медицинским персоналом стандартных профилактических мер: повторное использование изделий однократного применения, низкая приверженность к обработке рук и применению перчаток, отсутствие дезинфекции поверхностей, многоразовых приборов и устройств, отсутствие стерилизации многоразовых инструментов. Вспышки при таких манипуляциях, как эндоскопические вмешательства [40], визуализация перфузии миокарда [41], компьютерная томография [30, 31, 42], эндомиокардиальная биопсия [43], также были связаны с невыполнением основных профилактических мер.

В учреждениях, проводящих гемодиализ, главную роль в передаче инфекций играет отсутствие дезинфекции окружающих пациента поверхностей, в учреждениях онкогематологического профиля — множественные нарушения, относящиеся к стандартным профилактическим мерам. В учреждениях длительного пребывания, особенно пациентов, страдающих сахарным диабетом, особую важность имеют иммунопрофилактика гепатита В и применение индивидуальных устройств для глюкометрии.

Гемотрансфузии в передаче гемоконтактных инфекций в настоящее время имеют значение только в странах с низкими ресурсами.

ВИЧ как нозокомиальная инфекция регистрируется редко, однако вспышка в Пакистане демонстрирует значение искусственного механизма в передаче данной инфекции в странах с низкими ресурсами и недостаточное внимание к данной проблеме.

Заключение

Гемоконтактные инфекции характеризуются присутствием большого числа скрытых форм, что создаёт угрозу распространения инфекций при несоблюдении стандартных профилактических мер, которые в настоящее время играют ключевую роль в нозокомиальной передаче. Обследование доноров и пациентов из группы высокого риска на регулярной основе имеет высокое значение. К пациентам высокого риска относятся пациенты, получающие гемодиализ, онкогематологические пациенты и пациенты с сахарным диабетом.

Для предотвращения передачи гемоконтактных инфекций важно проведение расследования вспышек с последующим внедрением регламентов работы (стандартных операционных процедур) с акцентом на выполнение стандартных профилактических мер. Для выполнения регламентов необходимо регулярное обучение персонала, мотивирование и контроль приверженности к их выполнению. В описанных вспышках, где причины и факторы не

были идентифицированы, внедрение стандартных профилактических мер в сочетании с обучением и контролем имели решающую роль в предотвращении дальнейшего распространения инфекций. Придерживаться выполнения стандартных профилактических мер важно во всех учреждениях, оказывающих медицинскую помощь, но наибольшее значение соблюдение профилактических мер имеет в учреждениях высокого риска, а именно в отделениях гемодиализа, онкогематологических, амбулаторных клиниках, домах престарелых, интернатах, отделениях, где проходят лечение пациенты с сахарным диабетом.

Вакцинация против гепатита В имеет значение среди иммунокомпрометированных пациентов и пациентов старшего возраста, а в странах с низкими ресурсами является неотъемлемой частью профилактики нозокомиальной передачи гепатита В среди всех контингентов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ / REFERENCES

- Prati D. Transmission of hepatitis C virus by blood transfusion and other medical procedures: a global review. *J. Hepatol.* 2006; 45(4): 607–16. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2006.07.003>
- Busch M.P., Kleinman S.H., Nemo G.J. Current and emerging infectious risks of blood transfusions. *JAMA.* 2003; 289(8): 959–62. <https://doi.org/10.1001/jama.289.8.959>
- Lanini S., Puro V., Lauria F.N., Fusco F.M., Nisii C., Ippolito G. Patient to patient transmission of hepatitis B virus: a systematic review of reports on outbreaks between 1992 and 2007. *BMC Med.* 2009; 7: 15. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-7-15>
- Hauri A.M., Armstrong G.L., Hutin Y.J. The global burden of disease attributable to contaminated injections given in health care settings. *Int. J. STD AIDS.* 2004; 15(1): 7–16. <https://doi.org/10.1258/095646204322637182>
- Hayashi T., Hutin Y.J., Bulterys M., Altaf A., Allegranzi B. Injection practices in 2011–2015: a review using data from the demographic and health surveys (DHS). *BMC Health Serv. Res.* 2019; 19(1): 600. <https://doi.org/10.1186/s12913-019-4366-9>
- Wreghitt T.G. Blood-borne virus infections in dialysis units – a review. *Rev. Med. Virol.* 1999; 9(2): 101–9. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-1654\(199904/06\)9:2%3C101::aid-rmv234%3E3.0.co;2-u](https://doi.org/10.1002/(sici)1099-1654(199904/06)9:2%3C101::aid-rmv234%3E3.0.co;2-u)
- Recommendations for preventing transmission of infections among chronic hemodialysis patients. *MMWR Recomm. Rep.* 2001; 50: 1–43.
- Fabrizi F., Messa P. Transmission of hepatitis C virus in dialysis units: a systematic review of reports on outbreaks. *Int. J. Artif. Organs.* 2015; 38(9): 471–80. <https://doi.org/10.5301/ijao.5000437>
- Fabrizi F., Dixit V., Messa P., Martin P. Transmission of hepatitis B virus in dialysis units: a systematic review of reports on outbreaks. *Int. J. Artif. Organs.* 2015; 38(1): 1–7. <https://doi.org/10.5301/ijao.5000376>
- Finelli L., Miller J.T., Tokars J.I., Alter M.J., Arduino M.J. National surveillance of dialysis-associated diseases in the United States, 2002. *Semin. Dial.* 2005; 18(1): 52–61. <https://doi.org/10.1111/j.1525-139x.2005.18108.x>

ОБЗОРЫ

11. Chapter: 303 Health Care – Acquired Hepatitis. In: Kamboj M., Sepkowitz K.A. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Elsevier; 2020.
12. Stevens M.P., Edmond M.B. Health care-associated transmission of hepatitis B and C in oncology care. *Clin. Liver. Dis.* 2010; 14(1): 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2009.11.006>
13. Styczynski J., Wysocki M., Koltan S., Kurylak A. Epidemiologic aspects and preventive strategy of hepatitis B and C viral infections in children with cancer. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2001; 20(11): 1042–9. <https://doi.org/10.1097/00006454-200111000-00008>
14. Pessoni G.C., Marinho T.A., Carneiro M.M.S., Martins R.M., Soares C.C., Silva L.N., et al. Hepatitis B virus infection among oncohematologic disease patients in Central Brazil: prevalence, risk factors and immunization. *Hematol. Transfus. Cell. Ther.* 2019; 41(3): 199–204. <https://doi.org/10.1016/j.htct.2018.11.008>
15. Kose S., Olmezoglu A., Gozaydin A., Ece G. Seroprevalence of hepatitis B and C among oncology patients in Turkey. *J. Health Popul. Nutr.* 2011; 29(6): 652–5. <https://doi.org/10.3329/jhpn.v29i6.9903>
16. Ramsey S.D., Unger J.M., Baker L.H., Little R.F., Loomba R., Hwang J.P., et al. Prevalence of hepatitis B virus, hepatitis C virus, and HIV infection among patients with newly diagnosed cancer from academic and community oncology practices. *JAMA Oncol.* 2019; 5(4): 497–505. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.6437>
17. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Transmission of hepatitis C virus through transplanted organs and tissue — Kentucky and Massachusetts, 2011. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2011; 60(50): 1697–700.
18. Cornberg M., Razavi H.A., Alberti A., Bernasconi E., Buti M., Cooper C., et al. A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Europe, Canada and Israel. *Liver. Int.* 2011; 31: 30–60. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2011.02539.x>
19. Sievert W., Altraif I., Razavi H.A., Abdo A., Ahmed E.A., Alomair A., et al. A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Asia, Australia and Egypt. *Liver. Int.* 2011; 31: 61–80. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2011.02540.x>
20. Centers for Disease Control and Prevention. Healthcare-Associated Hepatitis B and C Outbreaks (≥ 2 cases) Reported to the CDC 2008-2019. Viral Hepatitis Outbreaks. Report May 11, 2020. Available at: <https://www.cdc.gov/hepatitis/outbreaks/healthcarehepoutbreaktable.htm>
21. Thompson N.D., Perz J.F., Moorman A.C., Holmberg S.D. Non-hospital health care-associated hepatitis B and C virus transmission: United States, 1998-2008. *Ann. Intern. Med.* 2009; 150(1): 33–9. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-150-1-200901060-00007>
22. Heikens E., Hetem D.J., Jousma-Rutjes J.P.W., Nijhuis W., Bolland G.J., Hommes N.H., et al. Hepatitis C virus transmission in a Dutch haemodialysis unit: detailed outbreak investigation using NS5A gene sequencing. *J. Hosp. Infect.* 2019; 101(3): 333–8. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.11.015>
23. Duong C.M., McLaws M.L. An investigation of an outbreak of hepatitis C virus infections in a low-resourced hemodialysis unit in Vietnam. *Am. J. Infect. Control.* 2016; 44(5): 560–6. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2016.01.014>
24. Altaf A., Pasha S., Vermund S.H., Shah S.A. A second major HIV outbreak in Larkana, Pakistan. *J. Pak. Med. Assoc.* 2016; 66(12): 1510–1.
25. Dencs A., Hettmann A., Martyin T., Jekkel C., Bányai T., Takács M. Phylogenetic investigation of nosocomial transmission of hepatitis C virus in an oncology ward. *J. Med. Virol.* 2011; 83(3): 428–36. <https://doi.org/10.1002/jmv.21983>. PMID: 21264863
26. Büchner A., Du Plessis N.M., Reynders D.T., Omar F.E., Mayaphi S.H., Haeri Mazanderani A.F., et al. Nosocomial outbreak of hepatitis B virus infection in a pediatric hematology and oncology unit in South Africa: Epidemiological investigation and measures to prevent further transmission. *Pediatr. Blood Cancer.* 2015; 62(11): 1914–9. <https://doi.org/10.1002/psc.25605>.
27. Kološová A., Gašparovič J. Viral hepatitis B and C outbreak related to parenteral treatment at an oncological department in Slovakia. *J. Hosp. Infect.* 2016; 93(2): 211–4. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2016.01.013>
28. Greeley R.D., Semple S., Thompson N.D., High P., Rudowski E., Handschur E., et al. Hepatitis B outbreak associated with a hematology-oncology office practice in New Jersey, 2009. *Am. J. Infect. Control.* 2011; 39(8): 663–70. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2010.11.011>
29. Diercke M., Monazahian M., Petermann H., Gerlich W.H., Schüttler C.G., Wend U., et al. Hepatitis B outbreak in a nursing home associated with reusable lancet devices for blood glucose monitoring, Northern Germany 2010. *J. Med. Virol.* 2015; 87(4): 583–8. <https://doi.org/10.1002/jmv.24104>
30. Balmelli C., Merlani G., Martinetti G., Reinholz D., Paolucci S., Baldanti F., et al. Outbreak of hepatitis C virus infections originating from a breach in safe injection practices before contrast-enhanced computed tomography scanning. *J. Hosp. Infect.* 2020; 106(3): 600–4. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.05.041>
31. Benson A.A., Wolf D., Lederman N., Safadi R. Direct-acting antivirals response in an acute nosocomial genotype 1b HCV outbreak. *Dig. Liver. Dis.* 2018; 50(6): 630–2. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2018.03.011>
32. Ross R.S., Viazov S., Khudyakov Y.E., Xia G.L., Lin Y., Holzmann H., et al. Transmission of hepatitis C virus in an orthopedic hospital ward. *J. Med. Virol.* 2009; 81(2): 249–57. <https://doi.org/10.1002/jmv.21394>
33. Pan X., Jiang J., Ma Q., Zhang J., Yang J., Chen W., et al. Outbreak of HIV infection linked to nosocomial transmission, China, 2016-2017. *Emerg. Infect. Dis.* 2018; 24(12): 2141–9. <https://doi.org/10.3201/eid2412.180117>
34. Cheng V.C.C., Wong S.C., Wong S.C.Y., Sridhar S., Yip C.C.Y., Chen J.H.K., et al. Nosocomial transmission of hepatitis C virus in a liver transplant center in Hong Kong: implication of reusable blood collection tube holder as the vehicle for transmission. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 2018; 39(10): 1170–7. <https://doi.org/10.1017/ice.2018.175>
35. Altaf A., Iqbal S., Shah S.A. A third major human immunodeficiency viruses (HIV) outbreak in Larkana, Pakistan: caused by unsafe injection practices. *J. Pak. Med. Assoc.* 2019; 69(8): 1068–9.
36. Mir F., Mahmood F., Siddiqui A.R., Baqi S., Abidi S.H., Kazzi A.M., et al. HIV infection predominantly affecting children in Sindh, Pakistan, 2019: a cross-sectional study of an outbreak. *Lancet. Infect. Dis.* 2020; 20(3): 362–70. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30743-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30743-1)
37. Gupta E., Bajpai M., Sharma P., Shah A., Sarin S. Unsafe injection practices: a potential weapon for the outbreak of blood borne viruses in the community. *Ann. Med. Health Sci. Res.* 2013; 3(2): 177–81. <https://doi.org/10.4103/2141-9248.113657>
38. Bergervoet P.W., van Riessen N., Sebens F.W., van der Zwet W.C. Application of the forensic Luminol for blood in infection control. *J. Hosp. Infect.* 2008; 68(4): 329–33. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2008.01.026>
39. Froio N., Nicastrì E., Comandini U.V., Cherubini C., Felicioni R., Solmone M., et al. Contamination by hepatitis B and C viruses in the dialysis setting. *Am. J. Kidney. Dis.* 2003; 42(3): 546–50. [https://doi.org/10.1016/s0272-6386\(03\)00787-x](https://doi.org/10.1016/s0272-6386(03)00787-x)
40. Fischer G.E., Schaefer M.K., Labus B.J., Sands L., Rowley P., Azzam I.A., et al. Hepatitis C virus infections from unsafe injection practices at an endoscopy clinic in Las Vegas, Nevada, 2007-2008. *Clin. Infect. Dis.* 2010; 51(3): 267–73. <https://doi.org/10.1086/653937>

41. Moore Z.S., Schaefer M.K., Hoffmann K.K., Thompson S.C., Xia G.L., Lin Y., et al. Transmission of hepatitis C virus during myocardial perfusion imaging in an outpatient clinic. *Am. J. Cardiol.* 2011; 108(1): 126–32. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2011.03.010>
42. Pañella H., Rius C., Cayla J.A.; Barcelona Hepatitis C Nosocomial Research Working Group. Transmission of hepatitis

- C virus during computed tomography scanning with contrast. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14(2): 333–6. <https://doi.org/10.3201/eid1402.060763>
43. Hunt S.A. Taking heart – cardiac transplantation past, present, and future. *N. Engl. J. Med.* 2006; 355(3): 231–5. <https://doi.org/10.1056/NEJMp068048>

Информация об авторах

Сацук Анастасия Владимировна[✉] — к.м.н., врач-эпидемиолог отделения общебольничного медицинского персонала НИИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, Москва, Россия, vnpoemp@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3293-2008>

Солопова Галина Геннадьевна — к.м.н., зам. главного врача по инфекционному контролю НИИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1680-7269>

Плоскирева Антонина Александровна — д.м.н., доцент, зам. директора ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора по клинической работе, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3612-1889>

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

Статья поступила в редакцию 22.12.2020;
принята к публикации 23.03.2021;
опубликована 20.06.2021

Information about the authors

Anastasija V. Sacuk[✉] — Cand. Sci. (Med.), epidemiologist, Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology», Moscow, Russia, vnpoemp@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3293-2008>

Galina G. Solopova — Cand. Sci. (Med.), Deputy chief physician for infection control, Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology», Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1680-7269>

Antonina A. Ploskireva — D. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Deputy director for clinical work, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3612-1889>

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.

The article was submitted 22.12.2020;
accepted for publication 23.03.2021;
published 20.06.2021



Нарушения кишечной микробиоты при расстройствах аутистического спектра: новые горизонты в поиске патогенетических подходов к терапии. Часть 3. Потенциальные стратегии влияния на ось кишечник–мозг для коррекции симптомов расстройств аутистического спектра

Благонравова А.С., Жилиева Т.В., Квашнина Д.В.✉

Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия

Аннотация

Третья часть обзора литературы, посвящённого роли нарушений кишечной микробиоты в патогенезе расстройств аутистического спектра (РАС), содержит анализ опубликованной литературы о возможных интервенционных подходах в отношении кишечной микробиоты при РАС и оценку эффективности различных типов вмешательств, которые изучались в эксперименте и клинической практике. Приведены имеющиеся к настоящему времени данные о возможности коррекции кишечной микробиоты при РАС с помощью диеты, приёма пре- и пробиотиков, антибиотикотерапии, а также об эффективности трансплантации кишечной микробиоты. Анализ опубликованных данных свидетельствует о том, что дальнейшая разработка подходов к коррекции дисбиоза кишечника при РАС может дать безопасные и, вероятно, эффективные в отношении поведенческих симптомов подходы, но это требует дальнейших рандомизированных контролируемых исследований для подтверждения эффективности и безопасности с позиции доказательной медицины, поскольку имеющиеся к настоящему времени исследования являются малочисленными и разрозненными, в связи с чем их можно считать предварительными.

Ключевые слова: расстройства аутистического спектра, микробиота, пробиотики, пребиотики, антибиотики, диетотерапия, трансплантация кишечной микробиоты

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

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

Для цитирования: Благонравова А.С., Жилиева Т.В., Квашнина Д.В. Нарушения кишечной микробиоты при расстройствах аутистического спектра: новые горизонты в поиске патогенетических подходов к терапии. Часть 3. Потенциальные стратегии влияния на ось кишечник–мозг для коррекции симптомов расстройств аутистического спектра. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2021;98(3):331–338. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-84>

Review article
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-84>

Disturbances of intestinal microbiota in autism spectrum disorders: new horizons in search for pathogenetic approaches to therapy. Part 3. Potential strategies of influence on gut-brain axis for correction of symptoms of autism spectrum disorders

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

Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia

© Коллектив авторов, 2021

Части 1 и 2 обзора опубликованы в предыдущих номерах журнала: Благонравова А.С., Жилиева 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 иммунологии*. 2021; 98(1): 65–72. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-62>; Благонравова А.С., Жилиева Т.В., Квашнина Д.В. Нарушения кишечной микробиоты при расстройствах аутистического спектра: новые горизонты в поиске патогенетических подходов к терапии. Часть 2. Ось кишечник–мозг в патогенезе расстройств аутистического спектра. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2021; 98(2): 221–230. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-83>

Abstract

The third part of the literature review on the role of intestinal microbiota disturbances in the pathogenesis of autism spectrum disorders (ASD) is devoted to the analysis of published literature on possible interventional approaches for intestinal microbiota in ASD and the evaluation of the effectiveness of various types of interventions that have been studied in experiment and in clinical practice. Presented are available data on the possibility of correcting the intestinal microbiota in ASD with diet, taking pre- and probiotics, antibiotic therapy, as well as the effectiveness of transplantation of intestinal microbiota. An analysis of published data suggests that further development of approaches for correcting intestinal dysbiosis in ASD may provide safe and probably effective strategy for behavioral symptoms, but this requires further randomized controlled trials to confirm efficacy and safety from the perspective of evidence-based medicine, since available to date studies are small and scattered, and therefore they can only be considered preliminary.

Keywords: *autism spectrum disorders, microbiota, probiotics, prebiotics, antibiotics, diet therapy, transplantation of intestinal microbiota*

Funding source. 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).

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

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 3. Potential strategies of influence on gut-brain axis for correction of symptoms of autism spectrum disorders. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(3):331–338. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-84>

Введение

Имеющиеся к настоящему времени данные говорят о возможной этиопатогенетической роли кишечного дисбиоза в развитии симптомов аутизма. Большое количество результатов исследований — как экспериментальных, так и клинических — подтверждают гипотезу о том, что кишечная микробиота может оказывать влияние на функционирование центральной нервной системы и, в частности, принимать участие в этиопатогенезе расстройств аутистического спектра (РАС). Сведения о молекулярных механизмах, реализующих взаимосвязь между мозгом и кишечником (ось кишечник–мозг), позволяют предположить возможность влияния на поведенческие симптомы, в частности симптомы РАС, путем воздействия на качественный, количественный состав и функционирование кишечной микробиоты.

Полной определённости относительно того, что первично в патогенезе аутизма — генетические особенности, нарушения поведения, функционально-биохимические особенности работы мозга и организма в целом пациентов с аутизмом и, как следствие, изменение состава микробиоты, или же, наоборот, первично-патогенетическое влияние изменённой микробиоты на особенности функционирования организма хозяина, — не существует. Несмотря на это накоплено достаточно сведений о целесообразности разработки интервенционных подходов.

Данная, завершающая часть обзора литературы посвящена анализу имеющихся результатов исследований о возможных интервенционных подходах в отношении кишечной микробиоты при РАС и оценке эффективности различных типов вмешательств, которые изучались в эксперименте и клинической

практике. В ряде исследований был продемонстрирован потенциал таких интервенционных подходов, как диета, антибиотики, пробиотики, пребиотики и трансплантация кишечной микробиоты [1–5].

Пребиотики *per os*

Пребиотики представляют собой неперевариваемые соединения (например, инулин, олигосахариды), которые метаболизируются в кишечном тракте и поддерживают пролиферацию полезных кишечных бактерий, таких как лактобациллы и бифидобактерии [6]. Показано, что галактоолигосахариды оказывают бифидогенный эффект у аутичных и неаутичных детей [7] и могут влиять на нейроэндокринную реакцию на стресс и бдительность у здоровых добровольцев [8], что косвенно свидетельствует о возможности влияния с помощью пребиотиков на ось мозг–кишечник. Следует отметить, что рандомизированных контролируемых исследований применения пребиотиков при РАС не встречается, поэтому данное направление к настоящему времени можно считать практически не изученным.

Пробиотики *per os*

Пробиотики — живые микроорганизмы, которые при введении в адекватных количествах оказывают положительное влияние на состояние здоровья хозяина [9].

Гипотетически введение пробиотиков может благоприятно влиять на слизистую оболочку кишечника, защищать эпителиальный барьер за счёт выработки муцина и укрепления межклеточных соединений, увеличивать выработку пищеварительных ферментов и антиоксидантов и модулировать иммунный ответ [10].

Несколько доклинических исследований показали потенциальные положительные эффекты пробиотиков при лечении неврологических заболеваний [11–16], результаты их были подтверждены клиническими испытаниями, проведёнными на людях [17, 18]. Поскольку пробиотики могут снижать интенсивность воспаления в кишечнике и ослаблять гастроинтестинальные симптомы у детей с воспалительными заболеваниями кишечника [19–22], по аналогии была выдвинута гипотеза, что пробиотики могут уменьшать воспалительное состояние в кишечнике и уменьшать поведенческие симптомы у детей с РАС [23].

В экспериментальной модели РАС на животных, созданной Е.У. Hsiao и соавт. с помощью материнской иммуноактивации, было получено потомство с аутистическим поведением, гастроинтестинальными расстройствами и аномальной кишечной микробиотой [20]. При этом пероральное введение *Bacteroides fragilis* (1×10^9 КОЕ) потомству улучшило проницаемость кишечника, восстановило кишечную микробиоту и улучшило аутистическое поведение, что, согласно авторам, позволяет рассматривать пробиотики в качестве эффективного и безопасного подхода в коррекции симптомов РАС.

Интересно, что в эксперименте в раннем онтогенезе только *Bacteroidetes* spp., но никакие другие виды, снижали тревожность, стереотипии и нарушения коммуникативного поведения, что указывает на то, что пробиотическая терапия требует определённой специфичности [20]. Аналогично введение *Lactobacillus reuteri*, но не других видов пробиотиков, приводило к редукции социальных нарушений, но не повторяющихся форм поведения и тревожности, что также указывает на специфичность эффектов конкретных штаммов пробиотиков. Более того, применение *Lactobacillus reuteri* способствовало повышению уровня окситоцина, участвующего в мезолимбической дофаминовой системе «вознаграждения», которая, предположительно, страдает при РАС [24, 25]. Роль дефицита окситоцина при РАС в настоящее время подтверждена в ряде исследований [26].

В недавнем исследовании, проведённом на хомяках, в котором аутистическое поведение было индуцировано назначением пропионовой кислоты (ППК) и клиндамицина, изучали терапевтический эффект 3-недельного приема *per os* смеси штаммов *Bifidobacteria* и *Lactobacilli* (Protexin®). Клиндамицин и ППК усиливали глутаматную эксайтотоксичность в мозге у хомяков, вызывая истощение Mg^{2+} и ГАМК [27]. Предыдущие исследования с ППК на животных показали, что дефицит Mg^{2+} , приводящий к избытку Ca^{2+} и глутамата, может лежать в основе повторяющихся форм поведения и социальных нарушений [27]. Кроме того, в образцах фекалий хомяков, получавших клиндамицин и ППК,

обнаружены изменения в микробиоте кишечника, ассоциированные с появлением видов *Clostridium* spp. При этом введение пробиотика Protexin® способствовало сохранению баланса микробиома и предотвращало развитие эксайтотоксичности.

В когортном исследовании 22 детей (4–10 лет) с РАС введение *Lactobacillus acidophilus* 2 раза в день *per os* в течение 2 мес улучшило их способность к концентрации и выполнению инструкций. При этом не выявлено влияния на поведенческие или эмоциональные нарушения [28].

А. Tomova и соавт. исследовали фекальную микрофлору 10 детей с аутизмом методом ПЦР в режиме реального времени. Обилие *Desulfovibrio* spp. в фекалиях и гастроинтестинальные нарушения у пациентов сильно коррелировали с выраженностью аутистического поведения. При этом добавление им к пище «Children Dophilus» (3 штамма *Lactobacillus* spp., 2 штамма *Bifidobacterium* spp. и 1 штамм *Streptococcus* spp.) 3 раза в день в течение 4 мес нормализовало соотношение *Bacteroidetes/Firmicutes*, снижало обилие *Desulfovibrio* spp., редуцировало уровень фактора некроза опухоли- α в фекалиях [29]. Однако клинической оценки после введения пробиотика не проводилось.

В 2 клинических случаях после введения пробиотика был показан регресс аутистических симптомов [30, 31], который, однако, сохранялся только до окончания терапии. Ежедневное введение мальчику с РАС и тяжёлыми когнитивными нарушениями смеси из 10 штаммов пробиотиков (VSL#3) приводило к снижению нейроповеденческих и гастроинтестинальных симптомов [31]. Согласно опросу лиц, осуществляющих уход, ежедневный прием Delpro®, смеси 5 пробиотических штаммов с иммуномодулятором Del-Immune V® (лизат *Lactobacillus rhamnosus* V) в течение 21 дня детьми с РАС может приводить к улучшениям в нескольких доменах (речь, социализация, коммуникабельность, когнитивные и поведенческие симптомы). Оценка проводилась с помощью «Autism Treatment Evaluation Checklist» (АТЕС) [32]. Однако это не рандомизированное клиническое исследование, и поэтому результаты следует интерпретировать с осторожностью.

Недавнее исследование включало 30 пациентов с РАС (5–9 лет), которым в течение 3 мес давали добавку, содержащую *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* и *Bifidobacteria longum*. Общие баллы, измеренные с помощью АТЕС, значительно снизились после приема пробиотиков ($p = 0,0001$), также отмечалось значимое снижение тяжести аутистических симптомов в категориях АТЕС речь/язык/общение ($p < 0,0001$) [33].

В рандомизированном клиническом исследовании с использованием пробиотиков приняли участие 75 новорождённых, после чего они наблю-

дались в течение 13 лет. В течение первых 6 мес жизни 40 детям давали *Lactobacillus rhamnosus* GG, другим участникам — плацебо. В возрасте 13 лет у 6 из 35 пациентов в группе плацебо были диагностированы синдром Аспергера или синдром дефицита внимания с гиперактивностью, при этом ни у одного из участников в группе пробиотиков эти состояния не обнаружены ($p = 0,008$). Высказано предположение, что введение *Lactobacillus* spp. в раннем возрасте может снизить риск дальнейшего развития синдрома Аспергера или синдрома дефицита внимания с гиперактивностью. Тем не менее выборка исследования очень малочисленна, требуются подтверждающие исследования. Кроме того, введение пробиотиков может действовать независимо от изменений кишечной микробиоты [34].

В рандомизированном двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании 62 детям с РАС в возрасте 3–16 лет давали *Lactobacillus plantarum* (штамм WCFS1) (суточная доза $4,5 \times 10^{10}$ КОЕ) в течение 3 нед. Дети были разделены на две группы: одни получали плацебо в течение первых 3 нед, а пробиотик в течение последующих 3 нед, вторые — наоборот. Воздействие на поведение и эмоции обоих режимов кормления (пробиотик и плацебо) оценивали с помощью стандартизированного психометрического инструмента «Development Behaviour Checklist». Различий между двумя группами не выявлено. При этом поведенческие и эмоциональные проблемы были значительно более выражены ($p < 0,05$) в начале исследования по сравнению с периодами приёма и пробиотика, и плацебо [35]. Это свидетельствует о значимом эффекте плацебо в исследованиях подобного типа, что усложняет понимание проблемы и говорит о необходимости дальнейших тщательно спланированных исследований.

Другие исследования показали, что пробиотики не могут нормализовать микробиоту и что следует изучать другие подходы (например, генно-инженерные бактерии) [36].

Таким образом, в исследованиях пробиотиков к настоящему времени получены неоднозначные клинические результаты, их недостатками были минимальный анализ микробиоты и отсутствие длительного последующего наблюдения [35]. Можно заключить, что возможное положительное влияние пробиотиков на нейроповеденческие симптомы у детей с РАС все еще остаётся спорным. Основными ограничениями упомянутых выше клинических испытаний являются отсутствие гомогенности групп испытуемых (по возрасту, наличию/отсутствию гастроинтестинальных симптомов, методам лечения и пищевым привычкам), небольшие размеры выборок, различные продолжительность и количество вводимых пробиотиков, а также различные шкалы, использовавшиеся для оценки симпто-

мов аутизма, либо вообще отсутствие клинической психопатологической оценки испытуемых. Мета-анализов и систематических обзоров по данной теме не встречается, что, очевидно, связано с большой разнородностью проведённых малочисленных исследований.

Трансплантация кишечной микробиоты

В отличие от пробиотиков, которые содержат лишь несколько видов бактерий из молочных культур, трансплантат фекальной микробиоты (ТФМ) содержит около тысячи видов бактерий, обитающих в кишечнике.

Трансплантация фекальной микробиоты и микробиота-трансферная терапия (МТТ) — модифицированный протокол ТФМ — недавно привлекли интерес исследователей из-за их эффективности при лечении рецидивирующих инфекций *Clostridium difficile* [37] и их многообещающей роли в лечении воспалительных заболеваний кишечника [38].

ТФМ заключается в переносе микробиоты фекалий от здоровых добровольцев пациентам с дисбактериозом кишечника, что может облегчить желудочно-кишечные и нейроповеденческие симптомы у детей с РАС за счёт восстановления баланса физиологической кишечной микробиоты [39]. Данный метод, по-видимому, является альтернативным и многообещающим новым подходом к лечению дисбактериоза кишечника при РАС. В открытом клиническом исследовании D.W. Kang и соавт. разработали модифицированный протокол ТФМ, который включал 14 дней перорального лечения ванкомицином с последующим 12–24-часовым очищением кишечника (запрет приёма пищи) и затем пероральным или ректальным введением стандартизированной микробиоты кишечника человека в течение 7–8 нед, сначала в высокой дозе орально или ректально с последующими ежедневными поддерживающими пероральными дозами и супрессией желудочной кислотности в течение 7–8 нед [17]. В исследование были включены 18 детей с РАС и гастроинтестинальными симптомами. В течение 18 нед мониторировали клинический ответ и кишечную микробиоту. Исследователи наблюдали улучшение поведенческих симптомов РАС, которое сохранялось в течение 8 нед после окончания лечения, и хорошую переносимость у пациентов (7–16 лет). Все 18 участников были повторно оценены через 2 года после прекращения лечения, у них наблюдались значительные улучшения как гастроинтестинальных, так и поведенческих симптомов по сравнению с исходными показателями. Улучшения со стороны желудочно-кишечного тракта в основном сохранялись после окончания лечения, а симптомы аутизма значительно улучшались даже после окончания лечения. Изменения в микробиоте кишечника сохранялись в течение 2 лет, в том числе

в отношении общего разнообразия сообществ и относительной численности *Bifidobacteria* и *Prevotella* [40]. Для подтверждения этих многообещающих результатов необходимы рандомизированные двойные слепые плацебо-контролируемые исследования с большим объемом выборок.

Других клинических исследований на людях, посвящённых изучению ТФМ при аутизме, в базах данных не обнаружено. Однако серьезным препятствием для дальнейшего развития данного направления является запрет ТФМ в связи с сообщениями о серьёзных нежелательных явлениях, в том числе летальных исходах, связанных с переносом донорских антибиотикорезистентных штаммов патогенных микроорганизмов.

Применение антибиотиков

Применение антибиотиков при РАС является спорным. Дети с РАС чаще страдают от инфекций среднего уха и поэтому чаще подвергаются лечению антибиотиками, чем дети без РАС [2, 41]. Использование антибиотиков при беременности может быть фактором риска аутизма [17]. В исследовании с использованием пироксифенирования здоровые люди подвергались воздействию ципрофлоксацина, и их микробиота оценивалась до и после лечения. Было обнаружено, что ципрофлоксацин снижает разнообразие бактерий [42]. Состав микробиоты в значительной степени вернулся к прежнему («доантибиотическому») состоянию через 4 нед; однако несколько видов не вернулись к исходной численности в течение 6 мес [42]. Очевидно, что антибиотики могут оказывать существенное влияние на состав кишечной микробиоты и, следовательно, могут быть «вмешивающимся» фактором в исследованиях по оценке кишечной микробиоты при РАС.

Тем не менее клиническое исследование 10 детей с РАС продемонстрировало улучшение аутистического поведения у 8 участников исследования после короткого перорального курса ванкомицина [43]. Однако улучшение поведенческих симптомов на фоне лечения ванкомицином было лишь временным. Положительные результаты объясняются авторами возможностью подавления ванкомицином патогенной микробиоты (клубридий), способных продуцировать токсины, потенциально задействованные в патогенезе аутизма. А нестойкий эффект, согласно авторам, связан с устойчивостью спор клубридий к ванкомицину, которые по окончании курса лечения в условиях снижения колонизационной резистентности кишечника прорастали в вегетативную форму. Возможно, широкое практическое применение таких агрессивных подходов при РАС, как антибиотикотерапия, может быть оправдано лабораторным подтверждением кишечного дисбиоза соответствующего типа (с преобладанием клубридий), наличия повышен-

ного синтеза соответствующих клубридриальных метаболитов с нейротоксическими свойствами и их влияния на поведенческие симптомы, однако в настоящее время это не представляется возможным в рутинной практике.

Диетотерапия

Несмотря на то что диета является важным вмешивающимся фактором, степень влияния диеты на микробный состав в популяции с РАС остается неясной.

К. Berding и соавт. исследовали зависимость состава микробиоты от пищевого поведения, потребления питательных веществ и типов пищи, а также от рациона питания [44]. Они обнаружили, что пищевые волокна отрицательно коррелируют с обилием *Clostridiales*. Численность *Faecalibacterium* положительно коррелировала с жареной пищей и отрицательно — с фруктами. Они также определили, что 2 различных режима питания были связаны с уникальными микробными профилями у детей с РАС [44]. Аналогично в исследовании, проведенном J. Plaza-Diaz и соавт., у детей с РАС также наблюдались отличительные особенности питания, коррелирующие с микробным составом кишечника [45].

В нескольких исследованиях было показано, что «западная» диета (с высоким содержанием животного белка и жиров и низким содержанием клетчатки) приводит к заметному уменьшению количества полезных бактерий — таких видов, как *Bifidobacterium* и *Eubacterium* [46]. Напротив, «средиземноморская» диета, которая высоко ценится как сбалансированная и положительно влияющая на воспалительный и липидный профиль, ассоциирована с увеличением *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* и *Prevotella* и снижением *Clostridium* [46]. Более того, показано, что изменения диеты могут вызывать серьёзные сдвиги в микробиоте уже в течение 24 ч [47]. Для прояснения взаимоотношения между диетой, кишечными бактериями и аутизмом в дальнейших исследованиях должен быть тщательно спланирован дизайн (включение валидизированных и объективных дневников питания, подробный пищевой анамнез и т.д.) [48]. Кроме того, необходимы локальные исследования в отдельных регионах мира, т.к. естественный отбор в течение длительного времени способствовал отбору генетических вариантов, оптимально соответствующих местному традиционному характеру питания.

Несмотря на то что данные о влиянии диеты на симптомы аутизма остаются весьма ограниченными и требуются дальнейшие исследования, последние обзоры литературы по этой теме констатируют, что диета наряду с назначением пробиотиков является наиболее многообещающим подходом из всех изученных в отношении коррекции микробиома при РАС в связи с наименьшим количеством огра-

ничений для практического применения и побочных эффектов [49].

Применение метабитиков

Согласно определению профессора Б.А. Шендерова, метабитики — это структурные компоненты пробиотических и микроорганизмов, и/или их метаболитов, и/или сигнальных молекул с определённой (известной) химической структурой, которые способны оптимизировать специфичные для организма хозяина физиологические функции, метаболические, эпигенетические, информационные, регуляторные, транспортные, иммунные, нейрогормональные, и/или поведенческие реакции, связанные с деятельностью симбиотической (индигенной) микробиоты организма-хозяина [50, 51].

Метабитики можно рассматривать в качестве средства нового поколения управления микрофлорой толстой кишки как экосистемой и метаболическим органом. Способность активных метаболитов проявлять антибактериальные свойства в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов (а также модулировать энергетический, информационный обмен, оказывать эпигеномное модулирующее действие, иммуномодуляторные эффекты и пр.), не влияя при этом на полезную микрофлору кишечника, может быть использована при коррекции нарушений микробиоты при различных патологических состояниях, в том числе РАС.

Заключение

Таким образом, из всех терапевтических подходов с позиции опосредованного влияния на нейроповеденческие симптомы РАС через кишечную микробиоту были относительно слабо изучены только пробиотики. Клинические испытания с ТФМ показали многообещающие результаты, но они крайне малочисленны. По сути, имеется сообщение только об одном исследовании при РАС, при этом слабо изучены безопасность и переносимость этого типа вмешательств.

Поскольку микробиота кишечника имеет многофакторное влияние на развитие поведенческих симптомов, опосредованное целым рядом механизмов — вероятно, независимых, но при этом дублирующих друг друга, — коррекцию кишечной микробиоты гипотетически оптимально проводить комплексно, с учётом состава, качественного и количественного разнообразия нормальной микробиоты и её множественных отличий от микробиоты при аутизме. При этом важным представляется не только донация здоровой микробиоты, но и подавление потенциально патогенной микрофлоры средствами с уже доказанной эффективностью при аутизме — в частности, для этих целей можно использовать ванкомицин, способный подавлять клостридиальную инфекцию.

Поскольку имеется много данных о роли метаболитов нарушенной микробиоты в качестве патогенов при РАС [52], представляется целесообразным поиск избирательных «хелаторов» в отношении бактериальных токсинов, например пропионатов, что до настоящего времени не изучалось даже в доклинических исследованиях. Кроме того, дефицит синтезируемых полезными бактериями кишечника биологически активных веществ (витаминов, отдельных аминокислот) может быть компенсирован приёмом их извне, что до сих пор не изучалось с точки зрения компенсации последствий дисбиоза при РАС и может стать многообещающим направлением исследований в рамках концепции метабитиков [50, 51].

Таким образом, разработка подходов к коррекции кишечного дисбиоза для воздействия на нейроповеденческие симптомы РАС находится на самом начальном этапе своего развития, является многообещающей темой, но требующей комплексного междисциплинарного подхода в изучении и тщательного планирования дизайна исследований с учётом принципов доказательной медицины.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ/REFERENCES

- Brandt L.J., Aroniadis O.C., Mellow M., Kanatzar A., Kelly C., Park T., et al. Long-term follow-up of colonoscopic fecal microbiota transplant for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Am. J. Gastroenterol.* 2012; 107(7): 1079–87. <https://doi.org/10.1038/ajg.2012.60>
- Moayyedi P., Quigley E.M.M., Lacy B.E., Lembo A.J., Saito Y.A., Schiller L.R., et al. The effect of fiber supplementation on irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* 2014; 109(9): 1367–74. <https://doi.org/10.1038/ajg.2014.195>
- Prantera C., Lochs H., Grimaldi M., Danese S., Scribano M.L., Gionchetti P., et al. Rifaximin-extended intestinal release induces remission in patients with moderately active Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2012; 142(3): 473–81. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.11.032>
- Tillisch K., Labus J., Kilpatrick L., Jiang Z., Stains J., Ebrat B., et al. Consumption of fermented milk product with probiotic modulates brain activity. *Gastroenterology.* 2013; 144(7): 1394–401. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.02.043>
- Youngster I., Sauk J., Pindar C., Wilson R.G., Kaplan J.L., Smith M.B., et al. Fecal microbiota transplant for relapsing *Clostridium difficile* infection using a frozen inoculum from unrelated donors: a randomized, open-label, controlled pilot study. *Clin. Infect. Dis.* 2014; 58(11): 1515–22. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu135>
- Estruch R., Ros E., Salas-Salvadó J., Covas M.I., Corella D., et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a mediterranean diet supplemented with extra-virgin olive oil or nuts. *N. Engl. J. Med.* 2018; 378(25): e34. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1800389>
- Toribio-Mateas M. Harnessing the power of microbiome assessment tools as part of neuroprotective nutrition and lifestyle medicine interventions. *Microorganisms.* 2018; 6(2): 35. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6020035>
- Guasch-Ferre M., Hu F.B., Ruiz-Canela M., Bulló M., Toledo E., Wang D.D., et al. Plasma metabolites from choline pathway and risk of cardiovascular disease in the PREDIMED

- (prevention with Mediterranean diet) study. *J. Am. Heart Assoc.* 2017; 6(11): e006524.
<https://doi.org/10.1161/JAHA.117.006524>
9. Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G.R., Merenstein D.J., Pot B., et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2014; 11(8): 506–14.
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
 10. Doenys C. Dietary interventions for autism spectrum disorder: New perspectives from the gut-brain axis. *Physiol. Behav.* 2018; 194: 577–82.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.07.014>
 11. Campbell-McBride N. Gut and psychology syndrome. *J. Orthomol. Med.* 2008; 23(2): 90–4.
 12. De Filippis F., Pellegrini N., Vannini L., Jeffery I.B., La Storia A., Laghi L., et al. High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. *Gut.* 2016; 65(11): 1812–21.
<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309957>
 13. Mari-Bauset S., Zazpe I., Mari-Sanchis A., Llopis-González A., Morales-Suárez-Varela M. Evidence of the gluten-free and casein-free diet in autism spectrum disorders: A systematic review. *J. Child Neurol.* 2014; 29(12): 1718–27.
<https://doi.org/10.1177/0883073814531330>
 14. Reichelt K.L., Knivsberg A.M. The possibility and probability of a gut-to-brain connection in autism. *Ann. Clin. Psychiatry.* 2009; 21(4): 205–11.
 15. Reichelt K.L., Tveiten D., Knivsberg A.M., Brønstad G. Peptides' role in autism with emphasis on exorphins. *Microb. Ecol. Health Dis.* 2012; 23: 18958.
<https://doi.org/10.3402/mehd.v23i0.18958>
 16. Sanctuary M.R., Kain J.N., Angkustsiri K., German J.B. Dietary considerations in autism spectrum disorders: the potential role of protein digestion and microbial putrefaction in the gut-brain axis. *Front. Nutr.* 2018; 5: 40.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00040>
 17. Kang D.W., Adams J.B., Gregory A.C., Borody T., Chittick L., Fasano A., et al. Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: An open-label study. *Microbiome.* 2017; 5(1): 10.
<https://doi.org/10.1186/s40168-016-0225-7>
 18. Whiteley P., Haracopos D., Knivsberg A.M., Reichelt K.L., Parlar S., Jacobsen J., et al. The ScanBrit randomised, controlled, single-blind study of a gluten- and casein-free dietary intervention for children with autism spectrum disorders. *Nutr. Neurosci.* 2010; 13(2): 87–100.
<https://doi.org/10.1179/147683010X12611460763922>
 19. Giannetti E., Staiano A. Probiotics for irritable bowel syndrome: clinical data in children. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2016; 63(Suppl. 1): S25–6.
<https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001220>
 20. 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>
 21. Liu F., Li J., Wu F., Zheng H., Peng Q., Zhou H. Altered composition and function of intestinal microbiota in autism spectrum disorders: A systematic review. *Transl. Psychiatry.* 2019; 9(1): 43.
<https://doi.org/10.1038/s41398-019-0389-6>
 22. Zhang Y., Li L., Guo C., Mu D., Feng B., Zuo X., et al. Effects of probiotic type, dose and treatment duration on irritable bowel syndrome diagnosed by Rome III criteria: A meta-analysis. *BMC Gastroenterol.* 2016; 16(1): 62.
<https://doi.org/10.1186/s12876-016-0470-z>
 23. Navarro F., Liu Y., Rhoads J.M. Can probiotics benefit children with autism spectrum disorders? *World J. Gastroenterol.* 2016; 22(46): 10093–102.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i46.10093>
 24. Buffington S.A., Di Prisco G.V., Auchtung T.A., Ajami N.J., Petrosino J.F., Costa-Mattioli M. Microbial reconstitution reverses maternal diet-induced social and synaptic deficits in offspring. *Cell.* 2016; 165(7): 1762–75.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.001>
 25. Donaldson Z.R., Young L.J. Oxytocin, vasopressin and the neurogenetics of sociality. *Science.* 2008; 322(5903): 900–4.
<https://doi.org/10.1126/science.1158668>
 26. Fetissov S.O., Averina O.V., Danilenko V.N. Neuropeptides in the microbiota-brain axis and feeding behavior in autism spectrum disorder. *Nutrition.* 2018; 61: 43–8.
<https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.10.030>
 27. El-Ansary A., Bacha A.B., Bjørklund G., Al-Orf N., Bhat R.S., Moubayed N., et al. Probiotic treatment reduces the autistic-like excitation/inhibition imbalance in juvenile hamsters induced by orally administered propionic acid and clindamycin. *Metab. Brain Dis.* 2018; 33(4): 1155–64.
<https://doi.org/10.1007/s11011-018-0212-8>
 28. Kaluzna-Czaplinska J., Blaszczyk S. The level of arabinol in autistic children after probiotic therapy. *Nutrition.* 2012; 28(2): 124–6.
<https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.08.002>
 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. Blades M. Autism: an interesting dietary case history. *Nutr. Food Sci.* 2000; 30(3): 137–9.
<https://doi.org/10.1108/00346650010319741>
 31. Grossi E., Melli S., Dunca D., Terruzzi V. Unexpected improvement in core autism spectrum disorder symptoms after long-term treatment with probiotics. *SAGE Open Med. Case Rep.* 2016; 4: 2050313X16666231.
<https://doi.org/10.1177/2050313X16666231>
 32. West R., Roberts E., Sichel L.S., Sichel J. Improvements in gastrointestinal symptoms among children with autism spectrum disorder receiving the Delpo® probiotic and immunomodulatory formulation. *J. Prob. Health.* 2013; 1(1): 1–6.
<https://doi.org/10.4172/2329-8901.1000102>
 33. Shaaban S.Y., El Gendy Y.G., Mehanna N.S., El-Senousy W.M., El-Feki H.S.A., Saad K., et al. The role of probiotics in children with autism spectrum disorder: A prospective, open-label study. *Nutr. Neurosci.* 2017; 21(9): 676–81.
<https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1347746>
 34. Pärtty A., Kalliomäki M., Wacklin P., Salminen S., Isolauri E. A possible link between early probiotic intervention and the risk of neuropsychiatric disorders later in childhood: A randomized trial. *Pediatr. Res.* 2015; 77(6): 823–8.
<https://doi.org/10.1038/pr.2015.51>
 35. Parracho H.M., Gibson G.R., Knott F., Bosscher D., Kleerebezem M., McCartney A.L. A double-blind, placebo-controlled, crossover-designed probiotic feeding study in children diagnosed with autistic spectrum disorders. *Int. J. Probiot. Prebiot.* 2010; 5(2): 69.
<https://doi.org/10.1186/s40168-018-0523-3>
 36. Belizário J.E., Napolitano M. Human microbiomes and their roles in dysbiosis, common diseases, and novel therapeutic approaches. *Front. Microbiol.* 2015; 6: 050.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01050>
 37. Pennesi C.M., Klein L.C. Effectiveness of the gluten-free, casein-free diet for children diagnosed with autism spectrum disorder: Based on parental report. *Nutr. Neurosci.* 2012; 15(2): 85–91.
<https://doi.org/10.1179/1476830512Y.0000000003>
 38. Ruskin D.N., Svedova J., Cote J.L., Sandau U., Rho, J.M., Kawamura M., et al. Ketogenic diet improves core symptoms of autism in BTBR mice. *PLoS ONE.* 2013; 8(6): e65021.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065021>

39. Castro K., Faccioli L.S., Baronio D., Gottfried C., Perry I.S., dos Santos Riesgo R. Effect of a ketogenic diet on autism spectrum disorder: A systematic review. *Res. Autism Spectr. Disord.* 2015; 20: 31–8. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2015.1133029>
40. Kang D., Adams J.B., Coleman D., Pollard E.L., Maldonado J., McDonough-Means S., et al. Long-term benefit of microbiota transfer therapy on autism symptoms and gut microbiota. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 5821. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42183-0>
41. Bagdasarian N., Rao K., Malani P.N. Diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* in adults a systematic review. *JAMA.* 2015; 313(4): 398–408. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.17103>
42. 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>
43. Parracho H.M.R.T., 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>
44. 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>
45. 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): 337. <https://doi.org/10.3390/nu11020337>
46. Singh R.K., Chang H.W., Yan D., Lee K.M., Ucmak D., Wong K., et al. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *J. Transl. Med.* 2017; 15(1): 73. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1175-y>
47. David L.A., Maurice C.F., Carmody R.N., Gootenberg D.B., Button J.E., Wolfe B.E., et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature.* 2014; 505(7484): 559–63. <https://doi.org/10.1038/nature12820>
48. Sivamaruthi B.S., Suganthy N., Kesika P., Chaiyasut C. The role of microbiome, dietary supplements, and probiotics in autism spectrum disorder. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2020; 17(8): 2647. <https://doi.org/10.3390/ijerph17082647>
49. Johnson D., Letchumanan V., Thurairajasingam S., Lee L.H. A revolutionizing approach to autism spectrum disorder using the microbiome. *Nutrients.* 2020; 12(7): 1983. <https://doi.org/10.3390/nu12071983>
50. Shenderov B.A., Sinita A.V., Zakharchenko M.M., Lang C. *Metabiotics: Present State, Challenges and Perspectives.* Cham, Switzerland: Springer Nature; 2020. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-34167-1>
51. Shenderov B.A., Tkachenko E.I., Lazebnik L.B., Ardatskaya M.D., Sinita A.V., Zakharchenko M.M. Metabiotics-novel technology of protective and treatment of diseases associated with microecological imbalance in human being. *Exp. Clin. Gastroenterol.* 2018; 151(3): 83–92.
52. Roussin L., Prince N., Perez-Pardo P., Kraneveld A.D., Rabot S., Naudon L. Role of the gut microbiota in the pathophysiology of autism spectrum disorder: clinical and preclinical evidence. *Microorganisms.* 2020; 8(9): 1369. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091369>

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>

Жильева 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, darja_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.

Статья поступила в редакцию 27.08.2020;
принята к публикации 20.10.2020;
опубликована 25.05.2021.

Information about the authors

Anna S. Blagoravova — 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 — Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Department of psychiatry, Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6155-1007>

Darya V. Kvashnina — Cand. Sci. (Med.), senior lecturer, Department of epidemiology, microbiology and evidence-based medicine, Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia, darja_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.

The article was submitted 27.08.2020;
accepted for publication 20.10.2020;
published 25.05.2021.

НАУКА И ПРАКТИКА

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-142>



Разработка и практическое применение методики для идентификации поверхностных антигенов *Borrelia miyamotoi*

Мионов К.О.^{1✉}, Титков А.В.¹, Кулешов К.В.¹, Колясникова Н.М.^{1,2},
Бондаренко Е.И.³, Платонов А.Е.¹

¹Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

²Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН», Москва, Россия;

³АО «Вектор-Бест», Новосибирск, Россия

Аннотация

Введение. *Borrelia miyamotoi* — возбудитель безэритемной формы иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ) — заболевания, широко распространённого в России. В геноме *B. miyamotoi* присутствуют гены десятков вариабельных основных поверхностных белков (Vmp). Vmp разделяют на два семейства — Vsp и Vlp (с подсемействами δ , γ , α и β). В конкретный момент времени отдельная *B. miyamotoi* экспрессирует единственный вариант гена Vmp.

Цель работы — создание методики для идентификации гена Vmp, находящегося в сайте экспрессии.

Материалы и методы. Методика реализована в формате мультиплексной ПЦР в режиме реального времени. Для её испытания были использованы образцы ДНК *B. miyamotoi*, выделенные из крови 172 больных ИКБ и 109 клещей. Образцы были собраны в 14 регионах России.

Результаты. Разработанная методика позволила идентифицировать экспрессирующийся Vmp в 82% исследованных проб, т.е. показала достаточную эффективность. Отрицательные результаты значимо реже наблюдались среди проб от больных, чем среди проб клещей. При этом доля проб с Vmp только одного типа одинакова среди клинических образцов и клещей, а доля проб, в которых детектируются одновременно два типа Vmp, значимо выше среди образцов от больных, где наиболее часто встречалась комбинация Vlp- δ и Vsp.

Обсуждение. Тот факт, что в образцах крови чаще выявляется сочетание двух типов Vmp, может говорить об одновременном присутствии нескольких субпопуляций *B. miyamotoi* в организме больных ИКБ. После того как к основному поверхностному белку штамма, занесённого клещом, вырабатываются протективные антитела, происходит переключение на синтез нового антигенного варианта Vmp. Такой феномен, называемый «иммунным избеганием», позволяет патогену персистировать в организме хозяина.

Заключение. Созданная методика мультиплексной ПЦР в режиме реального времени позволяет проводить одновременную детекцию нескольких антигенных вариантов вариабельных основных поверхностных белков *B. miyamotoi*. Изучение антигенного спектра штаммов *B. miyamotoi* в сопоставлении с характеристикой консервативных участков генома методом мультилокусного секвенирования позволит прояснить этапы эволюции и распространения *B. miyamotoi sensu lato*.

Ключевые слова: иксодовый клещевой боррелиоз, *Borrelia miyamotoi*, ПЦР, поверхностные основные вариабельные белки Vmp, вариабельные большие белки Vlp, вариабельные малые белки Vsp, иммунное избегание

Этическое утверждение. Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическими комитетами ЦНИИ Эпидемиологии (протокол № 83 от 26.06.2018) и Ижевской государственной медицинской академии (протокол № 17 от 24.12.2012).

Благодарность. Мы признательны всем исследователям, клиницистам и эпидемиологам, участвовавшим в сборе биологических образцов, использованных в настоящей работе, в первую очередь М.Г. Топорковой, Д.С. Сарксяну, С.Ю. Ковалеву, Е.И. Красновой, В.А. Рар, В.И. Черных, Н.С. Миноранской, А.Б. Коньковой-Рейдман.

Источник финансирования. Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 15-15-00072П).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи. В работе использованы наборы реагентов и реактивы «АмплиСенс®» производства ФБУН «Центральный НИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора.

Для цитирования: Миронов К.О., Титков А.В., Кулешов К.В., Колясникова Н.М., Бондаренко Е.И., Платонов А.Е. Разработка и практическое применение методики для идентификации поверхностных антигенов *Borrelia miyamotoi*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2021;98(3):339–350. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-142>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-142>

Development and application of the technique for identification of *Borrelia miyamotoi* surface antigens

Konstantin O. Mironov^{1✉}, Anton V. Titkov¹, Konstantin V. Kuleshov¹, Nadezhda M. Kolyasnikova^{1,2}, Evgeniy I. Bondarenko³, Alexander E. Platonov¹

¹Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia;

²Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of RAS, Moscow, Russia;

³JSC «Vector-Best», Novosibirsk, Russia

Abstract

Introduction. *Borrelia miyamotoi* is a pathogen causing erythema-free ixodid tick-borne borreliosis (ITBB), a disease widespread in Russia. The genome of *B. miyamotoi* contains genes of multiple variable major proteins (Vmps). Vmps fall into two families — Vsps and Vlps (with subfamilies δ , γ , α and β). At a particular time, a single *B. miyamotoi* expresses only one variant of Vmp gene.

The purpose of the work is to develop a technique for identification of the Vmp present at the expression site.

Materials and methods. The technique is designed in the format of a real-time multiplex PCR. It was tested by using *B. miyamotoi* DNA samples extracted from blood collected from 172 ITBB patients and 109 ticks. The samples were collected in 14 regions of Russia.

Results. The new technique made it possible to identify the expressed Vmp in 82% of the examined samples, thus having demonstrated its efficiency. Negative results were much less often observed with samples from patients than with samples from ticks. At the same time, the percentage of samples with one type of Vmp is identical for clinical samples and ticks, while the percentage of samples containing concurrently two types of Vmps is significantly higher among samples from patients with the most frequent occurrence of the Vlp- δ and Vsp combination.

Discussion. The frequent occurrence of the combination of two Vmp types in the blood samples can indicate the concurrent presence of several subpopulations of *B. miyamotoi* in ITBB patients. A new antigenic Vmp variant is synthesized after protective antibodies have been produced for the major protein of the strain transmitted by a tick. This phenomenon known as immune evasion allows the pathogen to persist within a host.

Conclusion. The developed technique of real-time multiplex PCR allows to simultaneously detect of several antigenic variants of the variable basic surface proteins of *B. miyamotoi*. The study of the antigenic spectrum of *B. miyamotoi* strains in comparison with the characteristics of conserved regions of the genome by the method of multilocus sequencing will clarify the stages of evolution and distribution of *B. miyamotoi sensu lato*.

Keywords: ixodid tick-borne borreliosis, *Borrelia miyamotoi*, PCR, variable major proteins Vmps, variable large proteins Vlps, variable small proteins Vsps, immune evasion

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committees of the Central Research Institute of Epidemiology (protocol N 83, 26.06.2018) and Izhevsk State Medical Academy (protocol N 17, 24.12.2012).

Acknowledgments. We are grateful to all researchers, clinicians and epidemiologists who participated in the collection of biological samples used in this work, primarily M.G. Toporkova, D.S. Sarksyian, S.Yu. Kovalev, E.I. Krasnova, V.A. Rahr, V.I. Chernykh, N.S. Minoranskaya, A.B. Kon'kova-Reidman.

Funding source. The study was supported by a grant from the Russian Science Foundation (project No. 15-15-00072П).

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article. All reagents for PCR and AmpliSens® *Borrelia miyamotoi*-FL reagent kit were made at the Central Research Institute of Epidemiology.

For citation: Mironov K.O., Titkov A.V., Kuleshov K.V., Kolyasnikova N.M., Bondarenko E.I., Platonov A.E. Development and application of the technique for identification of *Borrelia miyamotoi* surface antigens. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(3):339–350. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-142>

Введение

Borrelia miyamotoi — возбудитель безэритемной формы иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ). Впервые культуры *B. miyamotoi* были получены из клеща *Ixodes persulcatus* (штамм НТ31) и мыши *Apodemus argenteus* (штамм FR64b) в 1992 г. в Японии [1–3]. После обнаружения в 2003 г. сотрудниками ЦНИИ Эпидемиологии ДНК *B. miyamotoi* в крови больных с безэритемной формой ИКБ в Удмуртии активно изучаются биологические свойства возбудителя, особенности клинического течения и эпидемиологии ИКБ, вызванного *B. miyamotoi* (ИКБ-БМ) [3–10].

Основная сложность при изучении патогенеза ИКБ-БМ долгое время состояла в невозможности культивировать *B. miyamotoi* из организма заболевшего человека, что затрудняло проведение полногеномного анализа и полноценную генетическую характеристику патогенов. Позже эта проблема была решена [11–13]; на момент начала данного исследования были доступны полные нуклеотидные последовательности хромосом и последовательности всех или некоторых плазмид 10 штаммов *B. miyamotoi*: штамма FR64b, 3 штаммов СТ13–2396, СА17–2241 и LB-2001, выделенных из клещей на территории США [14, 15], и 6 штаммов Izh-4, Izh-5, Izh-14, Izh-16, Yekat-1, Yekat-6, выделенных из крови пациентов с ИКБ-БМ на территории России [11, 12, 16, 17].

B. miyamotoi экспрессируют переменные основные поверхностные белки (variable major protein, Vmp), к которым в восприимчивом организме в ходе инфекции вырабатываются IgM- и IgG-антитела, обладающие протективной активностью. На основании гомологии аминокислотных последовательностей Vmp разделяют на два семейства: Vlp (variable large proteins) и Vsp (variable small proteins) с размером приблизительно 330 и 200 аминокислот соответственно. Vlp подразделяют на 4 подсемейства или кластера: альфа (α), бета (β), гамма (γ) и дельта (δ). В российских штаммах было показано присутствие нескольких вариантов экспрессии Vmp и их сочетаний [14, 17, 18]. Далее мы упрощённо будем говорить об этих 5 вариантах белков (Vlp- δ , Vsp, Vlp- γ , Vlp- α и Vlp- β) как о типах Vmp. Отметим, что ранее некоторыми авторами первые 4 типа (или их представители) обозначались как Vlp15/16, Vsp1, Vlp5 и Vlp18 соответственно. Присутствие гена Vlp- β в геноме *B. miyamotoi* было впервые обнаружено в работе [17], он был назван нами по аналогии с гомологичным белком, экспрессируемым *B. hermsii* и другими возбудителями клещевых возвратных лихорадок. Среднее различие по аминокислотным последовательностям внутри типа Vmp составляет 20–40% [19], между типами — 55–80% (см., например, Fig. 4 и Fig. 5 в работе [17]).

Гены *Vmp* располагаются не на хромосоме, а на плаزمиде, которых в геноме изученных штаммов *B. miyamotoi* имеется более десятка [17]. При этом считается, что в конкретный момент времени единичная боррелия экспрессирует только один ген *Vmp*, находящийся в сайте экспрессии в непосредственной близости от бактериального промотора. Но у неё есть «запас» генов *Vmp* (от 30 до 50), которые при определённых условиях могут заменить прежний в сайте экспрессии и тем самым изменить антигенные свойства штамма [14, 17].

В эпидемиологии идентификация белка определённого класса, присущего конкретному штамму, позволяет проводить внутривидовую характеристику возбудителей, циркулирующих в разное время, на разных территориях и в разных источниках (резервуарах). Информация об антигенных свойствах возбудителей может быть потенциально использована в клинической практике для прогноза течения и исхода инфекционного процесса, а также для создания средств иммунопрофилактики — эффективного способа эпидемиологического контроля инфекционных заболеваний. Применительно к *B. miyamotoi* и другим боррелиям — возбудителям клещевых возвратных лихорадок и болезни Лайма — мишенью для антигенного типирования могут стать основные поверхностные белки.

Прямое серотипирование боррелий — возбудителей ИКБ-БМ пока мало информативно, поскольку выделено незначительное количество штаммов *B. miyamotoi*. Выявление антигенспецифических антител, продуцируемых в ходе заболевания, в принципе возможно [20, 21], но требует создания набора антигенов, не производимых пока с коммерческими целями, и, в случае использования планарных белковых иммуночипов, дополнительного оборудования, которое отсутствует в большинстве диагностических лабораторий [7, 22–26]. Кроме того, в некоторых случаях антитела к Vmp могут давать перекрёстные реакции, например антитела к Vlp- δ отчасти взаимодействуют с антигеном Vlp- γ , и наоборот.

Перспективным инструментом для характеристики антигенного разнообразия *B. miyamotoi* может быть использование основанных на ПЦР молекулярно-биологических методик, направленных на детекцию или секвенирование нуклеотидных последовательностей, кодирующих антигены. Подобные подходы разработаны и с успехом используются в отечественной эпидемиологической практике для других патогенных микроорганизмов [27], например пневмококков [28].

В этой связи **цель** данной работы заключалась в создании основанной на ПЦР методике и идентификации с её помощью переменных основных поверхностных белков, экспрессируемых *B. miyamotoi*, циркулирующими на территории России.

Таблица 1. Характеристика биологических образцов, содержащих ДНК *B. miyamotoi*
Table 1. Characteristics of biological samples containing *B. miyamotoi* DNA

Источник ДНК DNA source	Территория Territory	Годы Years	Количество образцов Number of samples
Кровь больных ИКБ-БМ Blood of patients with ixodes tick-borne borreliosis caused by <i>B. miyamotoi</i>	Свердловская область Sverdlovsk region	2015–2018	84
	Удмуртская Республика Udmurt Republic	2016	6
	Челябинская область Chelyabinsk region	2019	3
	Вологодская область Vologda region	2017	1
	Новосибирская область Novosibirsk region	2012, 2017, 2018	44
	Кемеровская область Kemerovo region	2018	16
	Красноярский край Krasnoyarsk Territory	2017–2019	14
	Иркутская область Irkutsk region	2014	2
	Хабаровский край Khabarovsk Territory	2014	2
	Всего Total		172
Суспензии клещей рода <i>Ixodes</i> Suspensions of ticks of <i>Ixodes</i> genus	Новосибирская область Novosibirsk region	2012, 2014, 2017	58
	Томская область Tomsk region	2014	17
	Республика Алтай Altai Republic	2016	6
	Свердловская область Sverdlovsk region	2013, 2014	18
	Амурская область Amur region	2016	10
	Всего Total		109

Материалы и методы

Последовательности ДНК

Для анализа последовательностей фрагментов генов *Vmp* с целью выбора олигонуклеотидов для ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РРВ) были использованы нуклеотидные последовательности штаммов Izh-4, Izh-5, Izh-14, Izh-16, Yekat-1 и Yekat-6, депонированные в GenBank (идентификационные номера CP024390-CP024407, CP024205-CP024222, CP024371-CP024389, CP024351-CP024370, CP024333-CP024350 и CP024316-CP024332 соответственно) [16, 17], дополненные анализом первичных последовательностей промоторов генов *Vmp*, выполненным в работах [14, 18].

Выделение ДНК, ПЦР и секвенирование

ДНК выделяли из биологических образцов от пациентов с ИКБ-БМ (осадок лейкоцитов в 100 мкл супернатанта, т.е. плазмы крови) набором «РИБО-преп» согласно инструкции к набору реагентов «АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL» (регистраци-

онное удостоверение РЗН 2018/7316 от 03.07.2018).

Образцы от клещей, собранных в Новосибирской области и на Дальнем Востоке, были предоставлены Е.И. Бондаренко. Присутствие в них ДНК *B. miyamotoi* (участка гена *glpQ*) было установлено с помощью диагностического ПЦР-теста «РеалБест ДНК *Borrelia miyamotoi*» (АО «Вектор-Бест», Новосибирск), регистрационное удостоверение № РЗН 2014/1405 от 26.05.2017 [29]. С.Ю. Ковалевым были предоставлены содержащие ДНК *B. miyamotoi* образцы от клещей, собранных в Свердловской и Томской областях.

В ПЦР, идентифицирующей *Vmp*, реакционная смесь объемом 25 мкл содержала праймеры, зонды и dNTP (0,44 мМ) — 10 мкл; реактивы «Полимераза TaqF» — 0,5 мкл и «ОТ-ПЦР-смесь-2 FEP/FRT» — 4,5 мкл; выделенную ДНК — 10 мкл. ПЦР-РРВ проводилась в формате «мультипрайм» на приборе «RotorGeneQ» («Qiagen») по следующей программе: 95°C — 15 мин (1 цикл); 95°C — 5 с/60°C — 20 с/72°C — 10 с (45 циклов с детекцией флуорес-

Таблица 2. Олигонуклеотиды для амплификации нуклеотидных последовательностей, кодирующих экспрессируемые белки Vlp и Vsp

Table 2. Oligonucleotides for amplification of nucleotide sequences encoding expressed Vlps and Vsps

Гены Genes	Олигонуклеотид (концентрация, мкМ) Oligonucleotide (concentration, μM)	5'-3'-последовательность* 5'-3'-nucleotide sequences
Vlp, Vsp	VMP-F2 (0,2)	TTATAAAgAATTTgAAAAGTAAgATTCTTgCACTAT
Vlp-δ	VLPRi-Ri (0,28)	CCCTTTCCCTAAATTAgCTATCgAAgTT
	VLPR-IZ (0,12)	FAM-CCTTTTgTggATCTTCCCCTCCTCCATTATTACATCC-BHQ1
	VLPR-IZ-L4 (0,12)**	FAM-gg+A+TC+T+TCCCC+TCC+TCC+AT-BHQ1
Vsp	I-16-2-Ri (0,28)	AATCACTgTCCCATCAgCCTTTg
	I-16-2-IIIz (0,12)	R6G-ggTCCCCCACTTCCACAAgATATCATTAC-BHQ1
	I-16-2-IIIz-L2 (0,12)**	R6G-CCCCCAC+TT+CC+AC+AA+gA+TA+TC-BHQ1
Vlp-γ	I-14-2-Ri (0,28)	CTgACTTTAAAAATCTACTCTgAggACTCTCT
	I-14-2-IIIz3 (0,12)**	Cy5-CCCgC+T+ACT+A+T+TACAgC+TCACg-BHQ2

Примечание. *FAM, R6G и Cy5 — флуорофоры; BHQ1 и BHQ2 — гасители флуоресценции. **Альтернативные зонды VLPR-IZ-L4 и I-16-2-IIIz-L2 обладают улучшенными термодинамическими параметрами за счёт использования, как и в структуре зонда I-14-2-IIIz3, конформационно-блокированных нуклеотидов (LNA), перед которыми стоит знак «+». В зондах VLPR-IZ и I-16-2-IIIz подчеркиванием выделены нуклеотидные последовательности, соответствующие зондам VLPR-IZ-L4 и I-16-2-IIIz-L2.

Note. Note. *FAM, R6G, and Cy5 — fluorophores; BHQ1 and BHQ2 — fluorescence quenchers. **Alternative probes VLPR-IZ-L4 and I-16-2-IIIz-L2 have improved thermodynamic parameters, as their structure, like the structure of the I-14-2-IIIz3 probe, incorporates locked nucleic acid (LNA) nucleotides preceded by the + sign. In VLPR-IZ and I-16-2-IIIz probes, the nucleotide sequences corresponding to probes VLPR-IZ-L4 and I-16-2-IIIz-L2 are underlined.

центного сигнала на стадии 60°C). При анализе результатов амплификации пороговая линия проводилась на уровне 10% от максимального значения флуоресцентного сигнала для каждого из 4 каналов детекции. Все реактивы для ПЦР были произведены в ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии.

Секвенирование продуктов ПЦР проводили с использованием генетического анализатора «3500xL» и соответствующих реагентов фирмы «Applied Biosystems» согласно инструкции изготовителя.

Биологический материал (источники ДНК *B. miyamotoi*)

Для проверки эффективности разрабатываемой методики использованы биологические образцы от пациентов с установленным диагнозом «ИКБ, безэритемная форма» (172 образца от 172 пациентов) [6–8, 29–31] и суспензии иксодовых клещей (109 образцов) [32, 33], собранных на территории ряда регионов России в рамках исследований эпидемиологии и клиники инфекции, вызванной *B. miyamotoi* (табл. 1). Образцы крови больных собирали, как правило, на пике лихорадки, в период максимальной спирохетемии. Все образцы содержали ДНК *B. miyamotoi*, что было подтверждено тестированием с использованием набора реагентов «АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL».

От всех пациентов было получено информированное согласие. Исследование образцов проведено в соответствии с разрешением этических комитетов ЦНИИ Эпидемиологии (протокол № 83 от 26.06.2018) и Ижевской государственной медицинской академии (протокол № 17 of 24.12.2012).

Статистические методы

Нижнюю и верхнюю границы доверительного интервала для доли проб определённого типа вычисляли по методу Уилсона [34] при доверительной вероятности («уровне доверия») 0,95¹. Для оценки значимости различий распределений качественных переменных в группах с помощью программы «SPSS Statistics v.19» («IBM») использовали точный критерий Фишера [35].

Результаты

ПЦР-PPV методика для антигенной характеристики *B. miyamotoi*

В геноме *B. miyamotoi* представлено значительное количество последовательностей, гомологичных генам белков Vlp и Vsp; последовательности находятся на плазмиде экспрессии либо на плазмиде хранения. Для детекции тех последовательностей, которым предположительно соответствуют белковые продукты, место отжига прямого праймера находилось в промоторной области, определённой по последовательности плазмиды IpB [14]. Места отжига обратных праймеров и зондов находились на последовательностях, соответствующих генам белков Vlp и Vsp. Выбранные олигонуклеотиды представлены в табл. 2.

Область отжига общего праймера VMP-F2 находится в промоторной области. Место отжига других праймеров и зондов, детектируемых по ка-

¹ Sergeant E.S.G. Epitools Epidemiological Calculators. Canberra: Ausvet; 2018. Available at: <http://epitools.ausvet.com.au>. В частности, <https://epitools.ausvet.com.au/ciproportion>

налам Green, Yellow и Red, находятся в областях, соответствующих белкам *Vip-δ*, *Vsp* и *Vip-γ*. Реакционная смесь содержала положительный внутренний контроль для детекции ДНК *B. miyamotoi* по каналу Orange — диагностические праймеры и зонд,

используемые в наборе реагентов «АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL».

Для валидации методики были использованы образцы ДНК российских изолятов *B. miyamotoi*. Во всех случаях были идентифицированы те и толь-

Таблица 3. Распределение генотипов экспрессируемых *Vmp* *B. miyamotoi*, определённых в биологических образцах
Table 3. Distribution of *Vmp* genotypes expressed by *B. miyamotoi* *Vmp* and detected in the biological samples

№ No	Тип гена <i>Vmp</i> в сайте экспрессии The type of <i>Vmp</i> gene at the expression site	Число образцов от больных Number of samples from patients	Доля проб определённого типа, % Percentage of samples of a specific genotype	Нижняя и верхняя границы 95% доверительного интервала* Lower and upper 95% confidence limits*	Число образцов от клещей Number of samples from ticks	Доля проб определённого типа, % Percentage of samples of a specific genotype	Нижняя и верхняя границы 95% доверительного интервала* Lower and upper 95% confidence limits*
1	Только <i>Vip-δ</i> <i>Vip-δ</i> only	63	36,6		38	34,9	
2	Только <i>Vsp</i> <i>Vsp</i> only	42	24,4		28	25,7	
3	Только <i>Vip-γ</i> <i>Vip-γ</i> only	12	7,0		5	4,6	
4	<i>Vip-δ</i> + <i>Vsp</i>	30	17,4		2	1,8	
5	<i>Vip-δ</i> + <i>Vip-γ</i>	1	0,6		1	0,9	
6	<i>Vsp</i> + <i>Vip-γ</i>	5	2,9		3	2,8	
7	Не определен ** Not identified	19	11,1	7,2–16,6	32	29,4	21,6–38,5
8	Всего образцов Total number of samples	172	100		109	100	
9	Всего положительных образцов (из 172 или 109) Total number of positive samples (from 172 or 109 samples)	153	89,0	83,4–92,8	77	70,6	61,5–78,4
10	Из них выявлен один тип <i>Vmp</i> [#] Among them — only one <i>Vmp</i> type is identified	117	68,0	60,7–74,5	71	65,1	55,8–73,4
11	Из них выявлены 2 типа <i>Vmp</i> ^{##} Among them — two <i>Vmp</i> types are identified ^{##}	36	20,9	15,5–27,6	6	5,5	2,6–11,5
12	<i>Vip-δ</i> , всего ^{&} <i>Vip-δ</i> , total ^{&}	94	49,7	42,7–56,8	41	49,4	38,9–59,9
13	<i>Vsp</i> , всего ^{&} <i>Vsp</i> , total ^{&}	77	40,7	34,0–47,9	33	39,8	29,9–50,5
14	<i>Vip-γ</i> , всего ^{&} <i>Vip-γ</i> , total ^{&}	18	9,5	6,1–14,6	9	10,8	5,8–19,3
15	Получено положительных сигналов, всего ^{&} Positive signals received, total ^{&}	189	100		83	100	

Примечание. *При доверительной вероятности («уровне доверия») 0,95; **положительный сигнал только по каналу детекции Orange: детекция присутствия в образце ДНК *B. miyamotoi*; #положительный сигнал по одному из каналов Green, Yellow или Red и по каналу детекции Orange: детекция присутствия в образце ДНК, кодирующей *Vmp*; ##положительный сигнал по 2 каналам из 3 (Green, Yellow или Red) и по каналу детекции Orange; &по одиночке или совместно с другим типом *Vmp*.

Note. *At a confidence level 0.95; **the positive signal only in the orange detection channel: the detection of *B. miyamotoi* DNA in the sample; #the positive signal in one of the green, yellow or red channel, and in the orange detection channel: The detection of the DNA encoding *Vmps* in the sample; ##the positive signal in 2 channels out of 3 (green, yellow, or red) and in the orange detection channel; &singly or together with another type of *Vmp*.

ко те типы экспрессированных *Vmp*, которые были присущи этим штаммам по данным полногеномного секвенирования [16, 17], а именно *Vlp-δ* у штаммов Izh-4 и Izh-5, *Vlp-γ* — у Izh-14, *Vsp* — у Yekat-1 и Yekat-6, а также одновременно *Vlp-δ* и *Vsp* — у Izh-16.

Определение экспрессируемых *Vmp* *B. miyamotoi* в образцах биологического материала

Результаты определения типов *Vmp* *B. miyamotoi* в биологических образцах, полученных от больных ИКБ-БМ и клещей представлены в табл. 3. Из протестированного 281 образца у 51 (18%) не удалось идентифицировать потенциально экспрессируемый ген *Vmp*: сигнал детектировался только по каналу Orange. В остальных 230 образцах детектировался положительный сигнал, при этом медианные значения пороговых циклов и их разброс составляли для каналов Green — 31 и 19–42, Yellow — 30 и 21–42, Red — 30 и 21–41. Эти значения соответствовали параметрам амплификации положительного внутреннего контроля — диагностической мишени в геноме *B. miyamotoi*, детектируемой по каналу Orange: медиана значений пороговых циклов — 28, разброс — 18–37.

Отрицательные результаты (табл. 3, строка 7) значимо реже наблюдаются среди проб от больных, чем среди проб клещей ($p = 0,0002$, двусторонний точный тест Фишера). При этом доля проб, в которых детектируется *Vmp* только одного типа (строка 10), практически одинакова среди клинических образцов и клещей ($p = 0,7$), а вот доля проб, в которых детектируются одновременно два типа *Vmp* (строка 11), значимо выше среди клинических образцов ($p = 0,0003$), и именно это приводит к снижению числа отрицательных проб. При более детальном рассмотрении типов гена *Vmp* и их комбинаций, обнаруживаемых в сайте экспрессии (строки 1–6), обращает на себя внимание комбинация *Vlp-δ* и *Vsp* (строка 4), часто выявляемая в образцах от пациентов ($p = 0,00003$). Остальные различия по встречаемости генотипов *Vmp* в образцах от больных ИКБ-БМ и клещей не значимы.

Из строк 1–6 табл. 3 очевидно, что встречаемость типов *Vmp* ранжируется от большей к меньшей: *Vlp-δ* → *Vsp* → *Vlp-γ*. Но нагляднее и правильнее оценить частоту встречаемости положительных сигналов по каждому из каналов детекции (строки 12–15), при этом сигнал, характерный для типа *Vmp*, учитывается вне зависимости от того, обнаружен он по одиночке или совместно с сигналом от другого типа *Vmp*. Такой анализ подтверждает ранжирование *Vlp-δ* → *Vsp* → *Vlp-γ* и подчёркивает тот факт, что встречаемость наиболее распространённых типов *Vmp* одинакова как при острой инфекции ИКБ-БМ, так и в клещах-переносчиках (вероятность верности нулевой гипотезы об отсутствии различий 0,94).

Региональные различия по экспрессии разных типов *Vmp*, как правило, не достигают статистической значимости, поскольку из многих регионов пока изучены лишь 10–20 образцов (табл. 1). Тем не менее можно отметить, что пробы от больных ИКБ-БМ из Свердловской области реже были отрицательными (у 2,4%), чем из Новосибирской области (у 15,9%), $p = 0,008$. При этом среди положительных образцов от больных ИКБ-БМ из Свердловской и Новосибирской областей относительные доли *Vlp-δ*, *Vsp* и *Vlp-γ* не различаются ($p = 0,71$) и близки к значениям, представленным в строках 12–14 табл. 3. С другой стороны, доля отрицательных проб клещей из Свердловской области (39%) и из Новосибирской области (29%) и относительные доли *Vlp-δ*, *Vsp* и *Vlp-γ* в клещах значимо не отличаются ($p > 0,45$).

Подтверждение верности идентификации экспрессируемых *Vmp* *B. miyamotoi*

У части проб нуклеотидные последовательности фрагментов генов *Vmp*, находящихся в сайте экспрессии, были установлены также путём секвенирования соответствующих фрагментов генома. По данным ПЦР-РПВ, в 19 из секвенированных проб экспрессировался ген *Vsp*, в 23 — *Vlp-δ* и в 11 — *Vlp-γ*.

Во всех случаях секвенированием подтверждена правильность результатов ПЦР-РПВ на образцах ДНК из клещей и крови больных и соответствие мест посадки в нуклеотидных последовательностях-мишенях последовательностям праймеров и зондов, которые первоначально были выбраны исходя из данных полногеномного секвенирования 6 российских изолятов.

Обсуждение

Разработанная методика показала достаточную эффективность при анализе биологических образцов, содержащих ДНК *B. miyamotoi*, и может далее широко применяться в существующем виде, а также усовершенствоваться. Основных путей развития два: добиться такой же эффективности при анализе других распространённых генотипов *B. miyamotoi* — «американских» и «европейского», и предусмотреть возможность определения экспрессии более редких генов *Vmp* — *Vlp-α* и *Vlp-β*. Работы в этом направлении ведутся.

Исследование принципиально новых аспектов генетики и эпидемиологии *B. miyamotoi* поставило и ряд новых вопросов, ответы на которые на данном этапе могут быть только гипотетическими. Во-первых, почему некоторые пробы ДНК *B. miyamotoi* из крови больных (11%) остаются отрицательными? Предварительные результаты показывают, что включение в систему идентификации дополнительных генов *Vlp-α* и *Vlp-β* снижает долю отрицательных

результатов лишь на несколько процентов. Поэтому они могут определяться ограничениями чувствительности ПЦР-РПВ либо вследствие низкой бактериальной нагрузки в образцах крови, либо из-за наличия ещё неизвестных мутаций в области посадки праймеров и зондов. Первый вариант представляется более вероятным, поскольку при тщательном проспективном исследовании больных ИКБ-БМ в Екатеринбурге [7, 11], своевременном отборе, хранении и транспортировке проб крови и/или ДНК в условиях холодной цепи долю отрицательных проб удаётся снизить до 3%. Второй вопрос: почему доля отрицательных проб ДНК *B. miyamotoi* из клещей (29%) значимо выше? Возможно, *B. miyamotoi*, находясь в клещах, не нуждаются в экспрессии *Vmp*, по крайней мере, *Vmp* наиболее распространённых типов: *Vlp-δ*, *Vsp* или *Vlp-γ*. Подобное явление известно для *B. burgdorferi sensu lato*, которые начинают экспрессировать OspC (outer surface protein C) только в крови человека, где OspC боррелий выполняет защитные функции, в частности препятствует активации системы комплемента на их поверхности [36]. Недавно было показано, что *Vlp-δ* и *Vlp-α* *B. miyamotoi* также ингибируют активацию системы комплемента по альтернативному пути [37].

Наконец, наиболее интригующий вопрос: почему в пробах крови больных ИКБ-БМ (строки 11 и 4 в табл. 3) наша методика ПЦР-РПВ нередко идентифицирует экспрессию двух типов *Vmp* (в 21%), чаще всего одновременно *Vlp-δ* и *Vsp* (в 17%)? Если мы исходим из постулата «единичная боррелия экспрессирует только один ген *Vmp*, находящийся в сайте экспрессии», то необходимо допустить, что в организме больного человека одновременно присутствует несколько субпопуляций *B. miyamotoi*. Это не двойная инфекция (микст-инфекция) двумя разными штаммами боррелий, но следствие образования «квазивидов» из одного «предка», находившегося в инфицирующем клеще. Квазивиды могут образовываться в результате фазовых вариаций, т.е. переключения синтеза белков, у части популяции патогена, колонизирующего организм хозяина. Фазовые вариации обычно имеют приспособительное значение. В случае обладающих антигенными свойствами поверхностных белков, в частности *Vmp*, изменение антигенного профиля предположительно делает боррелии менее чувствительными к бактерицидным антителам, выработавшимся к исходным вариантам антигенов. Такой феномен, называемый «иммунным избеганием» (immune escape), позволяет патогену продлить свое существование в организме хозяина как минимум до выработки антител к новым вариантам антигенов. Генетические механизмы фазовых вариаций детально изучаются на примере белка VlsE *B. burgdorferi sensu lato* [38]. В опытах на лабораторных животных и/или культуре бор-

релий показана принципиальная возможность переключения синтеза *Vmp* для *B. hermsii* [39, 40] и *B. miyamotoi* [18]. При остром заболевании ИКБ-БМ более половины пациентов продуцируют антитела к нескольким типам *Vmp* [7, 24], что является косвенным свидетельством наличия феномена «иммунного избегания» *in vivo*, равно как и обнаруженное в этой работе присутствие нескольких генотипов *Vmp*, экспрессирующихся в образцах от больных. При лабораторном заражении мелких грызунов российскими штаммами *B. miyamotoi* проявления «иммунного избегания» были документированы нами прямыми генетическими и серологическими методами [41]. Предположительно, именно из-за «иммунного избегания» у больных ИКБ-БМ в отсутствие адекватной антибиотикотерапии может наблюдаться несколько рецидивов лихорадки [42]. Рецидивирующее течение характерно для клещевых возвратных лихорадок и других возвратных лихорадок, например, для такого жизнеугрожающего заболевания, как боррелиозный вшивый возвратный тиф [2].

Заключение

По мере накопления клинических и полевых биологических образцов, содержащих ДНК возбудителя, в ходе дальнейших эпидемиологических исследований в регионах России и мира с помощью разработанной методики можно будет полнее изучить антигенный спектр штаммов *B. miyamotoi*, циркулирующих на различных территориях, в сопоставлении с характеристикой более консервативных участков их генома, например, методом мультилокусного секвенирования типирования [27]. Это позволит прояснить этапы эволюции и распространения боррелий *B. miyamotoi sensu lato* — возбудителей иксодового клещевого боррелиоза, практически не отличающегося по своей эпидемиологической значимости от хорошо известной болезни Лайма.

Второе направление исследования — анализ связи комплекса клинических проявлений и осложнений ИКБ-БМ с типом *Vmp*, экспрессированного в начале заболевания, и возможного переключения экспрессии («иммунного избегания») в течение инфекционного процесса.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Fukunaga M., Takahashi Y., Tsuruta Y., Matsushita O., Ralph D., McClelland M., et al. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia miyamotoi* sp. nov., isolated from the ixodid tick *Ixodes persulcatus*, the vector for Lyme disease in Japan. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1995; 45(4): 804–10. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-4-804>
2. Платонов А.Е., Малеев В.В., Карань Л.С. Боррелиозные возвратные лихорадки: забытые и новые. *Терапевтический архив.* 2010; 82(11): 74–80.
3. Cutler S., Vayssier-Taussat M., Estrada-Peña A., Potkonjak A., Mihalca A.D., Zeller H. A new *Borrelia* on the block: *Borrelia*

- miyamotoi* — a human health risk? *Euro Surveill.* 2019; 24(18): 1800170.
<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.18.1800170>
4. Карань Л.С., Колясникова Н.М., Махнева Н.А., Топоркова М.Г., Надеждина М.В., Есаулкова А.Ю. и др. Применение ПЦР в режиме реального времени для диагностики различных клещевых инфекций. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2010; 87(3): 72–7.
 5. Platonov A.E., Karan L.S., Kolyasnikova N.M., Makhneva N.A., Toporkova M.G., Maleev V.V., et al. Humans infected with relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(10): 1816–23.
<https://doi.org/10.3201/eid1710.101474>
 6. Сарксян Д.С. *Иксодовый клещевой боррелиоз, вызванный Borrelia miyamotoi, — клинико-эпидемиологическая характеристика, диагностика, лечение:* Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. М.; 2016.
 7. Платонов А.Е., Топоркова М.Г., Колясникова Н.М., Стуколова О.А., Долгова А.С., Бродовикова А.В. и др. Клиника иксодового клещевого боррелиоза, вызванного *Borrelia miyamotoi*, в контексте иммунного ответа на возбудитель. *Терапевтический архив.* 2017; 89(11): 34–42.
 8. Титков А.В., Платонов А.Е., Стуколова О.А., Миронов К.О., Дмитриева Г.М., Кострыкина Т.В. и др. Эпидемиологические особенности иксодовых клещевых боррелиозов в Красноярском крае в контексте изучения распространенности инфекции, вызываемой *Borrelia miyamotoi*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2018; 95(3): 10–8. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-3-10-18>
 9. Kingry L.C., Anacker M., Pritt B., Bjork J., Respcio-Kingry L., Liu G., et al. Surveillance for and discovery of borrelia species in US patients suspected of tick-borne illness. *Clin. Infect. Dis.* 2018; 66(12): 1864–71. <https://doi.org/10.1093/cid/cix1107>
 10. Marcos L.A., Smith K., Reardon K., Weinbaum F., Spitzer E.D. Presence of *Borrelia miyamotoi* infection in a highly endemic area of Lyme disease. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2020; 19(1): 22. <https://doi.org/10.1186/s12941-020-00364-0>
 11. Платонов А.Е., Коетсвелд Ж., Колясникова Н.М., Сарксян Д.С., Топоркова М.Г., Шипулин Г.А. и др. Микробиологическое подтверждение этиологии «иксодового клещевого боррелиоза в безэритемной форме» — инфекции, вызываемой *Borrelia miyamotoi*. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2017; 16(1): 29–35.
 12. Koetsveld J., Kolyasnikova N.M., Wagemakers A., Toporkova M.G., Sarksyas D.S., Oei A., et al. Development and optimization of an *in vitro* cultivation protocol allows for isolation of *Borrelia miyamotoi* from patients with hard tick-borne relapsing fever. *Clin. Microbiol. Infect.* 2017; 23(7): 480–4.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.01.009>
 13. Replogle A.J., Sexton C., Young J., Kingry L.C., Schriefer M.E., Dolan M., et al. Isolation of *Borrelia miyamotoi* and other *Borreliae* using a modified BSK medium. *Sci. Rep.* 2021; 11(1): 1926. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81252-1>
 14. Barbour A.G. Multiple and diverse vsp and vlp sequences in *Borrelia miyamotoi*, a hard tick-borne zoonotic pathogen. *PLoS One.* 2016; 11(1): e0146283.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146283>
 15. Kingry L.C., Replogle A., Batra D., Rowe L.A., Sexton C., Dolan M., et al. Toward a complete North American *Borrelia miyamotoi* genome. *Genome Announc.* 2017; 5(5).
<https://doi.org/10.1128/genomeA.01557-16>
 16. Kuleshov K.V., Koetsveld J., Goptar I.A., Markelov M.L., Kolyasnikova N.M., Sarksyas D.S., et al. Whole-genome sequencing of six *Borrelia miyamotoi* clinical strains isolated in Russia. *Genome Announc.* 2018; 6(1): e01424–17.
<https://doi.org/10.1128/genomeA.01424-17>
 17. Kuleshov K.V., Margos G., Fingerle V., Koetsveld J., Goptar I.A., Markelov M.L., et al. Whole genome sequencing of *Borrelia miyamotoi* isolate Izh-4: reference for a complex bacterial genome. *BMC Genomics.* 2020; 21(1): 16.
<https://doi.org/10.1186/s12864-019-6388-4>
 18. Wagemakers A., Koetsveld J., Narasimhan S., Wickel M., Deponte K., Bleijlevens B., et al. Variable major proteins as targets for specific antibodies against *Borrelia miyamotoi*. *J. Immunol.* 2016; 196(10): 4185–95.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600014>
 19. Koetsveld J., Platonov A.E., Kuleshov K., Wagemakers A., Hoonstra D., Ang W., et al. *Borrelia miyamotoi* infection leads to cross-reactive antibodies to the C6 peptide in mice and men. *Clin. Microbiol. Infect.* 2020; 26(4): 513.e1–513.e6.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.07.026>
 20. Harris E.K., Harton M.R., de Mello Marques M.A., Belisle J.T., Molins C.R., Breuner N., et al. Immunoproteomic analysis of *Borrelia miyamotoi* for the identification of serodiagnostic antigens. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 16808.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-53248-5>
 21. Tokarz R., Tagliafierro T., Caciula A., Mishra N., Thakkar R., Chauhan L.V., et al. Identification of immunoreactive linear epitopes of *Borrelia miyamotoi*. *Ticks. Tick. Borne. Dis.* 2020; 11(1): 101314.
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101314>
 22. Jahfari S., Herremans T., Platonov A.E., Kuiper H., Karan L.S., Vasilieva O., et al. High seroprevalence of *Borrelia miyamotoi* antibodies in forestry workers and individuals suspected of human granulocytic anaplasmosis in the Netherlands. *New Microbes New Infect.* 2014; 2(5): 144–9.
<https://doi.org/10.1002/nmi2.59>
 23. Jahfari S., Sarksyas D.S., Kolyasnikova N.M., Hovius J.W., Sprong H., Platonov A.E. Evaluation of a serological test for the diagnosis of *Borrelia miyamotoi* disease in Europe. *J. Microbiol. Methods.* 2017; 136: 11–6.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.02.013>
 24. Koetsveld J., Kolyasnikova N.M., Wagemakers A., Stukolova O.A., Hoonstra D., Sarksyas D.S., et al. Serodiagnosis of *Borrelia miyamotoi* disease by measuring antibodies against GlpQ and variable major proteins. *Clin. Microbiol. Infect.* 2018; 24(12): 1338.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.03.009>
 25. Krause P.J., Carroll M., Fedorova N., Brancato J., Dumouchel C., Akosa F., et al. Human *Borrelia miyamotoi* infection in California: serodiagnosis is complicated by multiple endemic *Borrelia* species. *PLoS One.* 2018; 13(2): e0191725.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191725>
 26. Stukolova O., Koetsveld J., Kolyasnikova N., Sarksyas D., Toporkova M., Karan L., et al. Antibody response in *Borrelia miyamotoi* infection studied by protein microarray. *Int. J. Infect. Dis.* 2019; 79: 18.
 27. Миронов К.О. *Молекулярно-биологический мониторинг в эпидемиологическом надзоре за гнойными бактериальными менингитами:* Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. М.; 2017. Available at: <http://www.crie.ru/pdf/disser1%28mironov%29.pdf>
 28. Миронов К.О., Корчагин В.И., Михайлова Ю.В., Янушевич Ю.Г., Шеленков А.А., Чагарян А.Н. и др. Характеристика штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от больных инвазивными пневмококковыми инфекциями, с использованием высокопроизводительного секвенирования. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2020; 97(2): 113–8.
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-113-118>
 29. Бондаренко Е.И., Позднякова Л.Л., Сибирцева С.Г., Тимофеев Д.И., Фоменко Н.В., Иванов М.К. Набор реагентов для выявления *Borrelia miyamotoi* — возбудителя клещевой возвратной лихорадки методом ПЦР в режиме реального времени. *Новости «Вектор-Бест».* 2013; 1(67): 2–8.
 30. Краснова Е.И., Савельева М.В., Хохлова Н.И., Проворова В.В., Пар В.А., Мельникова О.В. и др. Особенности клинических проявлений и лабораторной диагностики возвратной клещевой лихорадки, вызванной *Borrelia miyamotoi*, в

- Новосибирской области. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2017; (2): 10–5.
31. Конькова-Рейдман А.Б., Барсукова Д.Н., Бондаренко Е.И., Швалов А.Н., Лучинина С.В. Клинико-эпидемиологические особенности инфекций, экологически связанных с клещами, в Челябинской области. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2019; 24(4): 178–87. <https://doi.org/10.18821/1560-9529-2019-24-4-178-187>
 32. Бондаренко Е.И., Леонова Г.Н., Щучинова Л.Д., Щучинов Л.В., Суховеркова А.В., Иванов Л.И. и др. Распространенность *Borrelia miyamotoi* – возбудителя клещевой возвратной лихорадки — в семи регионах Сибири и Дальнего Востока. В кн.: *Молекулярная диагностика 2017. Сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием*. М.; 2017: 168–70.
 33. Mukhacheva T.A., Salikhova I.I., Kovalev S.Y. Multilocus spacer analysis revealed highly homogeneous genetic background of Asian type of *Borrelia miyamotoi*. *Infect. Genet. Evol.* 2015; 31: 257–62. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.02.009>
 34. Brown L.D., Cai T.T., DasGupta A. Interval estimation for a binomial proportion. *Statistical Science*. 2001; 16(2): 101–33. <https://doi.org/10.1214/ss/1009213286>
 35. Платонов А.Е. *Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы*. М.: ПАМН; 2000.
 36. Tufts D.M., Hart T.M., Chen G.F., Kolokotronis S.O., Diuk-Wasser M.A., Lin Y.P. Outer surface protein polymorphisms linked to host-spirochete association in Lyme borreliosis. *Mol. Microbiol.* 2019; 111(4): 868–82. <https://doi.org/10.1111/mmi.14209>
 37. Schmidt F.L., Sürth V., Berg T.K., Lin Y.P., Hovius J.W., Kraiczky P. Interaction between *Borrelia miyamotoi* variable major proteins Vlp15/16 and Vlp18 with plasminogen and complement. *Sci. Rep.* 2021; 11(1): 4964. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84533-x>
 38. Chaconas G., Castellanos M., Verhey T.B. Changing of the guard: how the Lyme disease spirochete subverts the host immune response. *J. Biol. Chem.* 2020; 295(2): 301–13. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.008583>
 39. Barbour A.G., Dai Q., Restrepo B.I., Stoenner H.G., Frank S.A. Pathogen escape from host immunity by a genome program for antigenic variation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006; 103(48): 18290–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605302103>
 40. Crowder C.D., Ghalyanchi Langeroudi A., Shojaee Estabragh A., Lewis E.R.G., Marcisin R.A., Barbour A.G. Pathogen and host response dynamics in a mouse model of *Borrelia hermsii* relapsing fever. *Vet. Sci.* 2016; 3(3): 19. <https://doi.org/10.3390/vetsci3030019>
 41. Платонов А.Е., Якименко В.В., Миронов К.О., Стуколова О.А., Титков А.В., Колясникова Н.М. и др. «Иммунное избегание» — один из механизмов патогенеза бактериальных инфекций (на примере иксодового клещевого боррелиоза, вызываемого *Borrelia miyamotoi*). В кн.: Покровский В.И., ред. *Инфекционные болезни в современном мире: эпидемиология, диагностика, лечение и профилактика. Сборник трудов XII Ежегодного Всероссийского интернет-конгресса по инфекционным болезням с международным участием*. М.; 2020.
 42. Сарксян Д.С., Малеев В.В., Платонов А.Е., Платонова О.В., Карань Л.С. Рецидивирующее (возвратное) течение заболевания, вызванного *Borrelia miyamotoi*. *Терапевтический архив*. 2015; 87(11): 18–25. <https://doi.org/10.17116/terarkh2015871118-25>
 43. *relia miyamotoi* sp. nov., isolated from the ixodid tick *Ixodes persulcatus*, the vector for Lyme disease in Japan. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1995; 45(4): 804–10. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-4-804>
 44. Platonov A.E., Maleev V.V., Karan' L.S. Relapsing fever borreliosis: forgotten and new ones. *Terapevticheskii arkhiv*. 2010; 82(11): 74–80. (in Russian)
 45. Cutler S., Vayssier-Taussat M., Estrada-Peña A., Potkonjak A., Mihalca A.D., Zeller H. A new *Borrelia* on the block: *Borrelia miyamotoi* — a human health risk? *Euro Surveill.* 2019; 24(18): 1800170. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.18.1800170>
 46. Karan' L.S., Kolyasnikova N.M., Makhneva N.A., Toporkova M.G., Nadezhkina M.V., Esaulkova A.Yu., et al. Usage of real time polymerase chain reaction for diagnostics of different tick-borne infections. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2010; 87(3): 72–7. (in Russian)
 47. Platonov A.E., Karan' L.S., Kolyasnikova N.M., Makhneva N.A., Toporkova M.G., Maleev V.V., et al. Humans infected with relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(10): 1816–23. <https://doi.org/10.3201/eid1710.101474>
 48. Sarksyian D.S. *Ixodic tick-borne borreliosis caused by Borrelia miyamotoi-clinical and epidemiological characteristics, diagnosis, treatment*: Diss. Moscow; 2016. (in Russian)
 49. Platonov A.E., Toporkova M.G., Kolyasnikova N.M., Stukolova O.A., Dolgova A.S., Brodovikova A.V., et al. Clinical presentation of ixodes tick-borne borreliosis caused by *Borrelia miyamotoi* in the context of an immune response to the pathogen. *Terapevticheskii arkhiv*. 2017; 89 (11): 34–42. (in Russian)
 50. Titkov A.V., Platonov A.E., Stukolova O.A., Mironov K.O., Dmitrieva G.M., Kostyriyina T.V., et al. Epidemiological features of ixodes tick-borne borreliosis in the Krasnoyarsk territory in the context of searching for the cases of infection caused by *Borrelia miyamotoi*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2018; 95(3): 10–8. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-3-10-18> (in Russian)
 51. Kingry L.C., Anacker M., Pritt B., Bjork J., Respicio-Kingry L., Liu G., et al. Surveillance for and discovery of *Borrelia* species in US patients suspected of tick-borne illness. *Clin. Infect. Dis.* 2018; 66(12): 1864–71. <https://doi.org/10.1093/cid/cix1107>
 52. Marcos L.A., Smith K., Reardon K., Weinbaum F., Spitzer E.D. Presence of *Borrelia miyamotoi* infection in a highly endemic area of Lyme disease. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2020; 19(1): 22. <https://doi.org/10.1186/s12941-020-00364-0>
 53. Platonov A.E., Koetsveld J., Kolyasnikova N.M., Sarksyian D.S., Toporkova M.G., Shipulin G.A., et al. Microbiological evidence of etiology «ixodes tick-borne borreliosis without erythema migrans» — infection caused by *Borrelia miyamotoi*. *Epidemiologiya i vaksinnoprofilaktika*. 2017; 16(1): 29–35. (in Russian)
 54. Koetsveld J., Kolyasnikova N.M., Wagemakers A., Toporkova M.G., Sarksyian D.S., Oei A., et al. Development and optimization of an *in vitro* cultivation protocol allows for isolation of *Borrelia miyamotoi* from patients with hard tick-borne relapsing fever. *Clin. Microbiol. Infect.* 2017; 23(7): 480–4. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.01.009>
 55. Replogle A.J., Sexton C., Young J., Kingry L.C., Schrieffer M.E., Dolan M., et al. Isolation of *Borrelia miyamotoi* and other *Borreliae* using a modified BSK medium. *Sci. Rep.* 2021; 11(1): 1926. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81252-1>
 56. Barbour A.G. Multiple and diverse vsp and vlp sequences in *Borrelia miyamotoi*, a hard tick-borne zoonotic pathogen. *PLoS One*. 2016; 11(1): e0146283. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146283>
 57. Kingry L.C., Replogle A., Batra D., Rowe L.A., Sexton C., Dolan M., et al. Toward a complete North American *Borrelia miyamotoi* genome. *Genome Announc.* 2017; 5(5). <https://doi.org/10.1128/genomeA.01557-16>

REFERENCES

1. Fukunaga M., Takahashi Y., Tsuruta Y., Matsushita O., Ralph D., McClelland M., et al. Genetic and phenotypic analysis of *Bor-*

16. Kuleshov K.V., Koetsveld J., Goptar I.A., Markelov M.L., Kolyasnikova N.M., Sarksyas D.S., et al. Whole-genome sequencing of six *Borrelia miyamotoi* clinical strains isolated in Russia. *Genome Announc.* 2018; 6(1): e01424–17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01424-17>
17. Kuleshov K.V., Margos G., Fingerle V., Koetsveld J., Goptar I.A., Markelov M.L., et al. Whole genome sequencing of *Borrelia miyamotoi* isolate Izh-4: reference for a complex bacterial genome. *BMC Genomics.* 2020; 21(1): 16. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6388-4>
18. Wagemakers A., Koetsveld J., Narasimhan S., Wickel M., De-ponte K., Bleijlevens B., et al. Variable major proteins as targets for specific antibodies against *Borrelia miyamotoi*. *J. Immunol.* 2016; 196(10): 4185–95. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600014>
19. Koetsveld J., Platonov A.E., Kuleshov K., Wagemakers A., Hoornstra D., Ang W., et al. *Borrelia miyamotoi* infection leads to cross-reactive antibodies to the C6 peptide in mice and men. *Clin. Microbiol. Infect.* 2020; 26(4): 513.e1–513.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.07.026>
20. Harris E.K., Harton M.R., de Mello Marques M.A., Belisle J.T., Molins C.R., Breuner N., et al. Immunoproteomic analysis of *Borrelia miyamotoi* for the identification of serodiagnostic antigens. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 16808. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53248-5>
21. Tokarz R., Tagliaferro T., Caciula A., Mishra N., Thakkar R., Chauhan L.V., et al. Identification of immunoreactive linear epitopes of *Borrelia miyamotoi*. *Ticks Tick Borne. Dis.* 2020; 11(1): 101314. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101314>
22. Jahfari S., Herremans T., Platonov A.E., Kuiper H., Karan L.S., Vasilieva O., et al. High seroprevalence of *Borrelia miyamotoi* antibodies in forestry workers and individuals suspected of human granulocytic anaplasmosis in the Netherlands. *New Microbes New Infect.* 2014; 2(5): 144–9. <https://doi.org/10.1002/nmi2.59>
23. Jahfari S., Sarksyas D.S., Kolyasnikova N.M., Hovius J.W., Sprong H., Platonov A.E. Evaluation of a serological test for the diagnosis of *Borrelia miyamotoi* disease in Europe. *J. Microbiol. Methods.* 2017; 136: 11–6. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.02.013>
24. Koetsveld J., Kolyasnikova N.M., Wagemakers A., Stukolova O.A., Hoornstra D., Sarksyas D.S., et al. Serodiagnosis of *Borrelia miyamotoi* disease by measuring antibodies against GlpQ and variable major proteins. *Clin. Microbiol. Infect.* 2018; 24(12): 1338. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.03.009>
25. Krause P.J., Carroll M., Fedorova N., Brancato J., Dumouchel C., Akosa F., et al. Human *Borrelia miyamotoi* infection in California: serodiagnosis is complicated by multiple endemic *Borrelia* species. *PLoS One.* 2018; 13(2): e0191725. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191725>
26. Stukolova O., Koetsveld J., Kolyasnikova N., Sarksyas D., Toporkova M., Karan L., et al. Antibody response in *Borrelia miyamotoi* infection studied by protein microarray. *Int. J. Infect. Dis.* 2019; 79: 18.
27. Mironov K.O. *Molecular biological monitoring in the epidemiological surveillance of purulent bacterial meningitis*: Diss. Moscow; 2017. Available at: <http://www.crie.ru/pdf/disser1%28mironov%29.pdf> (in Russian)
28. Mironov K.O., Korchagin V.I., Mikhaylova Yu.V., Yanushevich Yu.G., Shelenkov A.A., Chagaryan A.N., et al. Characterization of streptococcus pneumoniae strains causing invasive infections using whole-genome sequencing. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2020; 97(2): 113–8. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-113-118> (in Russian)
29. Bondarenko E.I., Pozdnyakova L.L., Sibirtseva C.G., Timofeev D.I., Fomenko N.V., Ivanov M.K. A comprehensive approach to revealing the infection causative agents transmitted by ticks using real-time PCR. *Novosti «Vektor-Best».* 2013; 1(67): 2–8. (in Russian)
30. Krasnova E.I., Savel'eva M.V., Khokhlova N.I., Provorova V.V., Rar V.A., Mel'nikova O.V., et al. Features of clinical manifestations and laboratory diagnosis of tick-borne relapsing fever caused by *Borrelia miyamotoi* in the novosibirsk region. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktual'nye voprosy.* 2017; (2): 10–5. (in Russian)
31. Kon'kova-Reydmann A.B., Barsukova D.N., Bondarenko E.I., Shvalov A.N., Luchinina S.V. Clinical and epidemiological features of infections ecologically related to ticks in the Chelyabinsk region. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni.* 2019; 24(4): 178–87. <https://doi.org/10.18821/1560-9529-2019-24-4-178-187> (in Russian)
32. Bondarenko E.I., Leonova G.N., Shchuchinova L.D., Shchuchinov L.V., Sukhoverkova A.V., Ivanov L.I., et al. The prevalence of *Borrelia miyamotoi* — the causative agent of tick-borne recurrent fever-in seven regions of Siberia and the Far East. In: *Molecular Diagnostics 2017. Proceedings of the IV All-Russian Scientific and Practical Conference with International Participation [Molekulyarnaya Diagnostika 2017. Sbornik trudov IX Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem]*. Moscow; 2017: 168–70. (in Russian)
33. Mukhacheva T.A., Salikhova I.I., Kovalev S.Y. Multilocus spacer analysis revealed highly homogeneous genetic background of Asian type of *Borrelia miyamotoi*. *Infect. Genet. Evol.* 2015; 31: 257–62. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.02.009>
34. Brown L.D., Cai T.T., DasGupta A. Interval estimation for a binomial proportion. *Statistical Science.* 2001; 16(2): 101–33. <https://doi.org/10.1214/ss/1009213286>
35. Platonov A.E. *Statistical Analysis in Medicine and Biology: Problems, Terminology, Logic, Computer Methods [Statisticheskii analiz v meditsine i biologii: zadachi, terminologiya, logika, komp'yuternye metody]*. Moscow: RAMN; 2000. (in Russian)
36. Tufts D.M., Hart T.M., Chen G.F., Kolokotronis S.O., Diuk-Wasser M.A., Lin Y.P. Outer surface protein polymorphisms linked to host-spirochete association in Lyme borreliae. *Mol. Microbiol.* 2019; 111(4): 868–82. <https://doi.org/10.1111/mmi.14209>
37. Schmidt F.L., Sürth V., Berg T.K., Lin Y.P., Hovius J.W., Kraiczky P. Interaction between *Borrelia miyamotoi* variable major proteins Vlp15/16 and Vlp18 with plasminogen and complement. *Sci. Rep.* 2021; 11(1): 4964. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84533-x>
38. Chaconas G., Castellanos M., Verhey T.B. Changing of the guard: how the Lyme disease spirochete subverts the host immune response. *J. Biol. Chem.* 2020; 295(2): 301–13. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.008583>
39. Barbour A.G., Dai Q., Restrepo B.I., Stoenner H.G., Frank S.A. Pathogen escape from host immunity by a genome program for antigenic variation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006; 103(48): 18290–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605302103>
40. Crowder C.D., Ghalyanchi Langeroudi A., Shojaee Estabragh A., Lewis E.R.G., Marcisisin R.A., Barbour A.G. Pathogen and host response dynamics in a mouse model of *Borrelia hermsii* relapsing fever. *Vet. Sci.* 2016; 3(3): 19. <https://doi.org/10.3390/vetsci3030019>
41. Platonov A.E., Yakimenko V.V., Mironov K.O., Stukolova O.A., Titkov A.V., Kolyasnikova N.M., et al. "Immune avoidance" is one of the mechanisms of pathogenesis of bacterial infections (for example, ixodic tick-borne borreliosis caused by *Borrelia miyamotoi*). In: Porkovskiy V.I., ed. *Infectious Diseases in the Modern World: Epidemiology, Diagnosis, Treatment and Prevention. Proceedings of the XII Annual All-Russian Internet Congress on Infectious Diseases with International Participation [Infeksion-*

nye bolezni v sovremennom mire: epidemiologiya, diagnostika, lechenie i profilaktika. Sbornik trudov XII Ezhegodnogo Vserossiyskogo internet-kongressa po infektsionnym boleznyam s mezhdunarodnym uchastiem. Moscow; 2020. (in Russian)

42. Sarkisyan D.S., Maleev V.V., Platonov A.E., Platonova O.V., Karan' L.S. Relapsing (recurrent) disease caused by *Borrelia miyamotoi*. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2015; 87(11): 18–25. <https://doi.org/10.17116/terarkh2015871118-25> (in Russian)

Информация об авторах

Миронов Константин Олегович[✉] — д.м.н., рук. научной группы разработки новых методов выявления генетических полиморфизмов ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, mironov@pcr.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4481-2249>

Титков Антон Владимирович — н.с. лаб. эпидемиологии природно-очаговых инфекций ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7548-9267>

Кулешов Константин Валерьевич — к.б.н., с.н.с. лаб. молекулярной диагностики и эпидемиологии кишечных инфекций ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5238-7900>

Колясникова Надежда Михайловна — к.м.н., зав. лаб. клещевого энцефалита и других вирусных энцефалитов ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия; н.с. лаб. эпидемиологии природно-очаговых инфекций ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9934-2582>

Бондаренко Евгений Иванович — к.м.н., н.с. лаб. ПЦР АО «Вектор-Бест», Новосибирск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4699-9548>

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>

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

Статья поступила в редакцию 18.03.2021;
принята к публикации 15.04.2021;
опубликована 01.06.2021

Information about the authors

Konstantin O. Mironov[✉] — D. Sci. (Med.), Head, Scientific group of developing new genetic polymorphisms detection methods, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, mironov@pcr.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8207-9215>

Anton V. Titkov — researcher, Laboratory of zoonoses, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7548-9267>

Konstantin V. Kuleshov — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of molecular diagnostics and epidemiology of intestinal infections, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5238-7900>

Nadezhda M. Kolyasnikova — Cand. Sci. (Med.), Head, Laboratory of tick-borne encephalitis and other viral encephalitis, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune- and-Biological Products of RAS; researcher, Laboratory of zoonoses, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9934-2582>

Evgeniy I. Bondarenko — Cand. Sci. (Med.), researcher, Laboratory of PCR, JSC «Vector-Best», Novosibirsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4699-9548>

Alexander E. Platonov — D. Sci. (Biol.), Prof., chief researcher, Laboratory of zoonoses, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7450-0081>

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.

The article was submitted 18.03.2021;
accepted for publication 15.04.2021;
published 01.06.2021



Распространённость туберкулеза у детей, перинатально экспонированных ВИЧ и ВИЧ-инфицированных, и предикторы его развития

Кукаркина В.А.^{1,2✉}, Голубкова А.А.³, Подымова А.С.¹

¹Областной центр профилактики и борьбы со СПИД, Екатеринбург, Россия;

²Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия;

³Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии, Москва, Россия

Аннотация

Цель исследования — установить факторы риска заболевания туберкулёзом (ТБ) детей, перинатально экспонированных ВИЧ и ВИЧ-инфицированных, для разработки коррекционных мероприятий.

Материалы и методы. Проанализированы амбулаторные карты (форма № 025/у) 216 детей, перинатально экспонированных ВИЧ, и 121 ребенка с ВИЧ-инфекцией и их родителей (281 человек). Контрольную группу составили 100 здоровых детей. В работе использованы эпидемиологический (описательно-оценочный и аналитический) и статистический методы исследования.

Результаты. Вероятность контакта с активной формой ТБ у детей, перинатально экспонированных ВИЧ и ВИЧ-инфицированных, была достоверно выше относительно детей контрольной группы ($p < 0,001$). Риски заболевания ТБ у детей, экспонированных ВИЧ, в очагах, где оба родителя были ВИЧ-инфицированными, в 5,3 раза превышали таковые в очагах, сформированных дискордантными парами ($RR = 5,3$; 95% ДИ 1,7–21,7). Дети исследуемых групп, не вакцинированные БЦЖ, подвержены наибольшему риску заболевания ТБ по сравнению с детьми контрольной группы ($RR = 1,9$; 95% ДИ 1,6–2,2).

Заключение. Факторами риска заболевания ТБ у детей, перинатально экспонированных ВИЧ, являются несвоевременная вакцинация против ТБ или ее отсутствие и проживание в очаге, где оба родителя были ВИЧ-инфицированными. Предикторами развития ТБ у ВИЧ-инфицированных детей был контакт с больными ТБ в семье, поздняя диагностика ВИЧ-инфекции и назначение высокоактивной антиретровирусной терапии позже 6 мес после постановки диагноза на фоне сформировавшейся иммуносупрессии.

Ключевые слова: дети, экспонированные ВИЧ, туберкулез, риски, предикторы

Этическое утверждение. Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом УГМУ (протокол № 9 от 18.11.2018).

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

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

Для цитирования: Кукаркина В.А., Голубкова А.А., Подымова А.С. Распространённость туберкулеза у детей, перинатально экспонированных ВИЧ и ВИЧ-инфицированных, и предикторы его развития. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(3):351–361.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-73>

Original article
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-73>

Prevalence of tuberculosis among perinatally exposed to HIV and HIV-infected children and predictors of its development

Vera A. Kukarkina^{1,2✉}, Alla A. Golubkova³, Anzhelika S. Podymova¹

¹Regional Center for the Prevention and Control of AIDS, Yekaterinburg, Russia;

²Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russia;

³Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Abstract

Purpose of the study. To establish risk factors for tuberculosis (TB) in children perinatally exposed to HIV and HIV-infected for the development of corrective measures.

Materials and methods. Outpatient records (form No. 025/y) of 216 children perinatally exposed to HIV and 121 children with HIV infection and their parents (281 individuals) were analyzed. The control group consisted of 100 healthy children. Epidemiological (descriptive, evaluative and analytical) and statistical research methods were used in the study.

Results. The likelihood of contact with a patient with an active form of TB was significantly higher in perinatally exposed to HIV and HIV-infected children compared to children in the control group ($p < 0.001$). The risk of TB in HIV-exposed children was 5.3 times higher in foci where both parents were HIV-infected than in foci formed by discordant couples (RR = 5.3; 95% CI 1.7–21.7). Children in study groups who were not vaccinated with BCG had the highest risk of TB compared to children in the control group (RR = 1.9; 95% CI 1.6–2.2).

Conclusion. Risk factors for TB in children perinatally exposed to HIV are untimely vaccination against TB or its absence and living in the foci where both parents are HIV-infected. The predictors of the development of TB in HIV-infected children are household contacts with TB patient, late diagnosis of HIV infection, and late prescription of highly active antiretroviral therapy after the formation of severe immunosuppression.

Keywords: children exposed to HIV, tuberculosis, risks, predictors

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Local Ethics Committee of the Ural State Medical University (Approval No. 9, 18.11.2018).

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

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

For citation: Kukarkina V.A., Golubkova A.A., Podymova A.S. Prevalence of tuberculosis among children perinatally exposed to HIV and HIV-infected and predictors of its development. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(3):351–361. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-73>

Введение

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), на долю лиц с ВИЧ-инфекцией приходится 9% от всех случаев туберкулеза (ТБ)¹, риск развития которого у живущих с ВИЧ в 18 (15–21) раз выше², а у детей в 42 раза выше, чем в общей популяции [1].

Данных о заболеваемости ТБ у ВИЧ-инфицированных детей в мире недостаточно, а доступную информацию трудно интерпретировать из-за проблем с диагностикой, неполной отчетностью и подбором исследуемых групп. По оценкам ВОЗ, распространенность ВИЧ среди детей с ТБ составляет 10–60% и варьирует в зависимости от фоновых показателей инфицирования ВИЧ [2].

В 2018 г. О.Б. Нечаевой были проведены расчеты заболеваемости ТБ среди постоянного населения России, инфицированного ВИЧ, которые сравнивали с заболеваемостью ТБ среди неинфицированного населения. Оказалось, что инфицированные ВИЧ болели ТБ в 58,6 раза чаще, чем лица с отрицательным ВИЧ-статусом (1764,3 на 100 тыс. инфицированных ВИЧ против 30,1 на 100 тыс. населения без ВИЧ) [3].

Ситуация усугублялась тем, что по мере роста количества пациентов с поздними стадиями ВИЧ-инфекции, увеличилась и доля лиц с коинфекцией ТБ. В России в 2008–2017 гг. отмечен прирост заболеваемости сочетанной патологией (ВИЧ и ТБ) на 3,5% (5,2‰ в 2008 г. против 7,1‰ в 2017 г.) [4]. При этом выросла смертность от ТБ при его сочетании с ВИЧ-инфекцией, которая в 2018 г. составляла 23% среди впервые выявленных пациентов ВИЧ и туберкулез [5].

С увеличением количества сочетанной патологии (ВИЧ + ТБ) среди взрослых вероятность инфицирования детей увеличивается от 60 до 85% [6, 7]. В ряде исследований показано, что рост заболеваемости ТБ у детей был обусловлен совместным проживанием с ВИЧ-инфицированными взрослыми [8].

ТБ у ВИЧ-инфицированных детей имеет свои особенности: высокая частота диссеминированных форм (71%) и высокая смертность, особенно у детей до 2 лет в связи с функциональной незрелостью их иммунной системы [9, 10].

На поздних стадиях ВИЧ-инфекции высока вероятность сочетания внелегочного ТБ с ТБ лёгких и диссеминации процесса [11]. Наиболее тяжёлые клинические формы ТБ, по мнению большинства авторов, возникают у пациентов с продвинутой стадией ВИЧ-инфекции, не получивших высокоактивную антиретровирусную терапию (ВААРТ) [12].

Наиболее уязвимой по ТБ группой являются дети в возрасте до 3 лет, особенно в очагах ТБ, в

¹ Юнэйдс. Информационный бюллетень «Глобальная статистика по ВИЧ». URL: https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_FactSheet_ru.pdf

² ВОЗ. Информационный бюллетень о туберкулезе от 14.10.2020. URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>

связи с практически отсутствием технологий активного оздоровления и превентивного лечения [13].

В ряде исследований подчеркивается значимость в развитии ТБ у любых групп пациентов социально-бытовых условий, влияющих как на преморбидный фон, так и на течение основного процесса [14]. Среди наиболее неблагоприятных факторов большинство авторов отмечают алкогольную и наркотическую зависимость взрослых членов семьи (как минимум матери), низкую материальную обеспеченность и морально-психологический климат в семье [15–18].

В настоящее время частота встречаемости и факторы риска заболевания ТБ у детей, перинатально экспонированных ВИЧ и ВИЧ-инфицированных, остаются недостаточно изученными.

Цель исследования — установить факторы риска заболевания ТБ детей, перинатально экспонированных ВИЧ и ВИЧ-инфицированных, для разработки коррекционных мероприятий.

Материалы и методы

В проспективном когортном исследовании с целью определения факторов риска заболевания ТБ были проанализированы амбулаторные карты (форма № 025у) 216 детей с перинатальным контактом по ВИЧ с нереализованной трансмиссией вируса и 121 ребенка с ВИЧ-инфекцией, в том числе 61 с ко-инфекцией (ВИЧ + ТБ), состоявших на диспансерном учёте в клинко-диагностическом отделении ГБУЗ СО «ОЦ СПИД».

Критерии включения в исследование: диспансерное наблюдение, проживание на территории Екатеринбурга и перинатальное инфицирование. Критерии исключения — проживание за пределами Екатеринбурга и иные пути заражения.

Для оценки степени отягощённости очагов ТБ, в которых проживали дети, была проанализирована 281 амбулаторная карта их родителей.

Контрольную группу составили 100 детей, рождённых в родильных домах г. Екатеринбурга от матерей с отрицательным ВИЧ-статусом и ТБ. Средний возраст детей в момент исследования в группе экспонированных ВИЧ составлял $3,9 \pm 2,7$ года (95% доверительный интервал (ДИ) 9,1–1,4), ВИЧ-инфицированных — $8,8 \pm 0,5$ (95% ДИ 19,7–1,4) и контрольной группе — $2,4 \pm 0,3$ года (95% ДИ 2,9–1,8).

Для оценки иммунного статуса детей с ВИЧ-инфекцией определяли количество CD4-лимфоцитов в момент постановки клинического диагноза. При оценке иммунных нарушений в соответствующих возрастных группах руководствовались клиническими рекомендациями «ВИЧ-инфекция у детей», утверждёнными Министерством здравоохранения РФ в 2017 г. № 459 (до 5 лет — по процентному содержанию CD4-лимфоцитов, старше 5 лет — по абсолютным данным CD4-лимфоцитов).

В работе использовали эпидемиологический (описательно-оценочный и аналитический) и статистические методы исследования. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программ «Microsoft Excel 2016» и «Statistics 23.0» («IBM SPSS Statistics»). Определяли среднюю арифметическую (M), стандартную ошибку показателя (m), среднее квадратическое отклонение, медиану (Me). Достоверность результатов исследования оценивали по критерию Пирсона (χ^2), критерию Стьюдента (t) и угловому распределению Фишера (ϕ). Факторы риска развития ТБ у ВИЧ-инфицированных детей определяли отношением шансов в пределах 95% ДИ. У детей, перинатально экспонированных ВИЧ, при помощи однофакторного анализа определяли относительный риск развития туберкулеза (RR). Для выявления независимых факторов риска был проведён логистический регрессионный анализ по методу пошагового отбора переменных. За величину уровня статистической значимости принимали $p < 0,05$.

Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом УГМУ (протокол № 9 от 18.11.2018). У родителей получено письменное информированное согласие на обработку их персональных данных и данных детей.

Результаты

В группе перинатально экспонированных ВИЧ 73,8% детей родились в полных семьях, в том числе более чем в половине из них оба родителя были ВИЧ-положительными (табл. 1).

В 17 семейно-квартирных очагах ТБ, в которых были больны ТБ родители, в контакте находились 22 ребенка. Более половины родителей, больных ТБ, были отнесены к 1-й группе диспансерного учёта. Заболеваемость ТБ отцов была в 1,9 раза выше, чем матерей ($8,5 \pm 2,6\%$ против $4,4 \pm 1,6\%$; $p > 0,05$).

Помимо ТБ, часть родителей были носителями вирусов гемоконтактных гепатитов и продолжали употреблять инъекционные наркотики. Показатель поражённости вирусными гепатитами матерей составлял $30,0 \pm 3,6\%$ и был в 2,2 раза выше, чем отцов — $13,6 \pm 3,2\%$ ($t = 3,4$; $p < 0,05$). Матери несколько чаще, чем отцы, употребляли инъекционные наркотики ($21,3 \pm 3,2\%$ против $17,8 \pm 3,5\%$; $p > 0,05$).

Частота формирования очагов ТБ у конкордантных и дискордантных пар имела существенные различия, составляя 19,5% против 4,9% соответственно ($\phi = 2,4$, $p < 0,01$). В семьях, где оба родителя были ВИЧ-инфицированными, активную форму ТБ диагностировали у 60% родителей, а в очагах с одним ВИЧ-инфицированным — у 50%.

При оценке рисков развития ТБ в очагах, сформированных дискордантными и конкордантными парами, установлено, что в очагах, где оба родителя

Таблица 1. Характеристика исследуемых групп
Table 1. Characteristics of children in the studied groups

Анализируемые параметры Analyzed parameters	Дети, экспонированные ВИЧ Children exposed to HIV (n = 216)		Дети с коинфекцией (ВИЧ + ТБ) Coinfected children (HIV + TB) (n = 61)		Дети с ВИЧ-инфекцией Children with HIV infection (n = 60)		Дети с негативным ВИЧ-статусом HIV-negative children (n = 100)	
	абс. abs.	%	абс. abs.	%	абс. abs.	%	абс. abs.	%
Родители Parents	160	100	61	100	60	100	100	100
Пары Couples	118	73,8	51	83,6	45	75,0	100	100
Отца нет No father	42	26,2	10	16,4	15	25,0	–	–
Конкордантные пары Concordant pairs	77	65,3	37	72,5	30	66,7	–	–
Дискордантные пары Discordant couples	41	34,7	14	27,5	15	33,3	–	–
Отец, потребляющий инъекционные наркотики Father is an injecting drug user	21	17,8	15	29,4	10	22,2	–	–
Мать, потребляющая инъекционные наркотики Mother is an injecting drug user	34	21,3	14	23,0	12	20,0	–	–
Мать и отец, потребляющие инъекционные наркотики Mother and father are injecting drug users	19	16,1	9	17,6	7	15,6	–	–
Отец с вирусом гепатита Father with viral hepatitis	16	13,6	4	7,8	3	6,7	–	–
Мать с вирусом гепатита Mother with viral hepatitis	48	30,0	15	24,6	26	43,3	2	2,0
Мать и отец с вирусом гепатита Mother and father with viral hepatitis	30	25,4	6	11,8	4	8,9	–	–
Отец с ТБ Father with hepatitis virus	10	8,5	14	27,5	4	8,9	–	–
в том числе умер от ТБ including those who died from TB	0	–	3	21,4	0	–	–	–
Мать с ТБ Mother with TB	7	4,4	17	27,9	6	10,0	–	–
в том числе умерла от ТБ including those who died from TB	0	–	6	35,3	0	–	–	–
Мать и отец с ТБ Mother and father with TB	0	–	13	25,5	3	6,7	–	–
в том числе умерли от ТБ including those who died from TB	0	–	4	30,8	0	–	–	–

были ВИЧ-инфицированы, вероятность заболеть ТБ у детей была в 5,3 раза выше таковой в очагах с дискордантными по ВИЧ-инфекции парами (RR = 5,3; 95% ДИ 1,7–21,7; табл. 2).

Имели место различия в привитости контактных против ТБ. В очагах, сформированных дискордантными парами, все дети были вакцинированы против ТБ, хотя и не всегда своевременно. В очагах, сформированных конкордантными парами, были вакцинированы 90% детей, однако только треть из них — в родильном доме, остальные две трети — на 1-м году жизни и в возрасте старше 1 года.

Часть детей (10%) не были привиты по причине отказа от прививок родителей, в том числе у 1 ребенка был диагностирован ТБ внутригрудных лимфатических узлов, что в последующем стало причиной медицинского отвода от прививки БЦЖ.

Учитывая, что одним из факторов риска заболевания ТБ у детей считается их несвоевременная вакцинация, были проанализированы календарные сроки проведения прививки БЦЖ у детей исследуемых групп и их иммунный статус (табл. 3).

Установлено, что доля детей из перинатального контакта по ВИЧ, не привитых против ТБ в ро-

Таблица 2. Риски инфицирования ТБ детей, перинатально экспонированных ВИЧ

Table 2. Risks of TB infection in children perinatally exposed to HIV

Характеристика семей по ВИЧ-инфекции Characteristics of families by HIV infection status	n	Очаги ТБ Foci of TB				Количество среди контактных детей Number among contact children		Из них заболели ТБ Of them got sick with TB	
		всего total		в том числе группы диспансерного учёта IA и IB including dispensary registration groups IA and IB		абс. abs.	% от пар % of couples	абс. abs.	%
		абс. abs.	% от пар % of couples	абс. abs.	%				
Конкордантные пары Concordant couples	77	15	19,5	9	60,0	20	26,0	1	5,0
Дискордантные пары Discordant couples	41	2	4,9	1	50,0	2	4,9	–	–
RR (95% ДИ) Relative risk (95% CI)		4,0 (1,0–16,6)		1,2 (0,3–5,1)		5,3 (1,7–21,7)			

дильном доме, составляла 65,7%, а детей с ВИЧ-инфекцией — 38,8%, т.е. в 3,7 и 2,2 раза превышала таковую в контрольной группе (18%). Следовательно, дети из групп наблюдения, не привитые против ТБ, были подвержены большему риску инфицирования по сравнению с детьми контрольной группы. У детей с ВИЧ-инфекцией вероятность контакта с больным ТБ была в 4,7 раза выше по сравнению с ВИЧ-экспонированными детьми (табл. 4).

Более половины родителей детей в группах наблюдения были носителями вирусов гемоконтактных гепатитов, в том числе вирусного гепатита С (90%; $p < 0,001$). В отличие от родителей детей контрольной группы, они продолжали употреблять инъекционные наркотики, хотя достоверных различий по частоте их употребления в группах наблюдения не установлено.

Для оценки значимости отдельных факторов риска заболевания ТБ у детей был проведен сравнительный анализ 9 показателей, для этого были сформированы две группы: в первую включили 61 ребенка с коинфекцией (ВИЧ + ТБ), во вторую — 60 детей с ВИЧ-инфекцией без ТБ (табл. 5).

Средний возраст выявления ВИЧ-инфекции у детей с коинфекцией составил $25,8 \pm 3,4$ мес (95% ДИ 19,4–33,5), в отличие от детей с моноинфекцией, где возраст выявления ВИЧ-инфекции составлял $18,5 \pm 4,1$ мес (95% ДИ 11,2–27,5), что укладывается во временные рамки диагностики ВИЧ³. У детей с сочетанной патологией (ВИЧ + ТБ) время назначения ВААРТ от момента постановки диагноза ВИЧ-инфекции в 8,6 раза превышало таковое у детей с моноинфекцией ($31,1 \pm 5,3$ мес против $3,6 \pm 1,5$ мес).

В процессе анализа было установлено, что наиболее значимыми факторами для развития ТБ у

детей с ВИЧ-инфекцией были наличие контакта с больным ТБ в семье, поздняя постановка диагноза ВИЧ-инфекции и назначение ВААРТ позже 6 мес после постановки диагноза на фоне уже сформировавшейся тяжелой иммуносупрессии.

На основании полученных результатов была разработана логистическая модель для расчета вероятности развития ТБ у детей с ВИЧ-инфекцией (табл. 6).

В процессе построения модели были установлены 5 независимых факторов, влияющих на заболеваемость ТБ детей с ВИЧ-инфекцией:

- контакт с больным ТБ ($p = 0,0001$);
- поздняя диагностика ВИЧ-инфекции ($p = 0,04$);
- тяжёлая иммуносупрессия в момент постановки диагноза ($p = 0,004$);
- назначение ВААРТ позже 6 мес от момента постановки диагноза ($p = 0,001$);
- девиантное поведение родителей ($p = 0,01$).

Отсутствие вакцинации против ТБ у ВИЧ-инфицированных детей не было фактором риска заболевания, однако при оценке эффективности вакцинации у детей с коинфекцией в разных возрастных группах установлено, что в возрастной группе от 3 до 6 лет заболеваемость ТБ непривитых детей была в 1,7 раза выше таковой у привитых (63,2% против 36,8%) (табл. 7).

Обсуждение

Свердловская область входит в число территорий, наиболее неблагополучных по заболеваемости сочетанной инфекцией ВИЧ + ТБ [4]. По данным отчетной формы № 61 «Сведения о контингентах больных ВИЧ-инфекцией», показатель распространённости коинфекции в 2018 г. в области составлял 22,1 на 100 тыс. жителей и был в 2,7 раза выше среднероссийского (8,5‰). В 2004–2018 гг. у детей с ВИЧ-инфекцией были зарегистрированы 84 случая заболевания ТБ. По данным отчетной

³ Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.5.2826-10 «Профилактика ВИЧ-инфекции». URL: <http://base.garant.ru/12184824/b89690251be5277812a78962f6302560>

Таблица 3. Характеристика иммунного статуса детей с ВИЧ-инфекцией в момент постановки диагноза ВИЧ, Me (Q_{25} – Q_{75})
Table 3. Characteristics of the immune status of children with HIV infection at the time of diagnosis, Me (Q_{25} – Q_{75})

Возраст, лет Age, years	Иммунные категории детей с коинфекцией (ВИЧ + ТБ) Immune categories of children with coinfection (HIV + TB)						Иммунные категории детей с ВИЧ-инфекцией Immune categories of children with HIV infection									
	отсутствие иммунодефицита lack of immunodeficiency		умеренный иммунодефицит moderate immunodeficiency		выраженный иммунодефицит manifest immunodeficiency		тяжелый иммунодефицит severe immunodeficiency		отсутствие иммунодефицита lack of immunodeficiency		умеренный иммунодефицит moderate immunodeficiency		выраженный иммунодефицит manifest immunodeficiency		тяжелый иммунодефицит severe immunodeficiency	
	n	CD4, кл/мкл CD4, cells/ μ l	n	CD4, кл/мкл CD4, cells/ μ l	n	CD4, кл/мкл CD4, cells/ μ l	n	CD4, кл/мкл CD4, cells/ μ l	n	CD4, кл/мкл CD4, cells/ μ l	n	CD4, кл/мкл CD4, cells/ μ l	n	CD4, кл/мкл CD4, cells/ μ l	n	CD4, кл/мкл CD4, cells/ μ l
< 1	5	39,0 (36,5–39,5)	3	34,0	3	27,0	13	18,0 (4,5–21,5)	19	44,0 (37,0–50,0)	9	34,0 (32,0–35,0)	5	28,0 (26,5–29,0)	10	20,0 (17,5–21,0)
1–3	5	33,0 (31,5–46,0)	3	27,0	2	22,0	16	9,5 (0–17,5)	2	34,5	1	26,0	2	20,5	3	17,0
3–5	2	32,5	1	24,0	0	0	3	3,0	4	33,5 (28,8–37,5)	0	0	0	0	1	3,0
> 5	3	1200	0	0	1	345	1	27	1	695	1	401	1	265	1	3
Всего Total	15	36,5 (32,3–45,8)	7	28,0 (25,0–34,0)	6	25,0 (22,0–28,0)	33	11,0 (0–18,0)	26	40,0 (36,0–50,0)	11	34,0 (31,8–35,0)	8	27,0 (21,0–28,0)	15	19,5 (15,5–20,3)

Примечание. Me – медиана количества CD4 клеток, интерквартильный размах (Q_{25} – Q_{75}) рассчитывали в возрастных группах.
Note. Me is the median CD4 cell count, interquartile range (Q_{25} – Q_{75}) was calculated per age groups.

формы № 33 «Сведения о больных туберкулезом», в 2009–2018 гг. заболеваемость детей, находившихся в бытовом контакте с больными активными формами ТБ, имела тенденцию к росту со среднегодовым темпом прироста 6% и была в 1,9 раза выше заболеваемости взрослых, находившихся в аналогичных условиях (**рисунок**).

Вероятность заболевания ТБ у детей из семей с ВИЧ-инфекцией является высокой по социальным и эпидемиологическим причинам.

В исследовании риска инфицирования детей ТБ (метаанализ), проведенном в США, установлено, что дети с ВИЧ-инфекцией имели более высокий риск заражения ТБ (OR 2,80; 95% ДИ 1,62–4,85) [12]. Исследования, проведенные на африканском континенте, подтвердили, что количество случаев ТБ и ВИЧ-инфекции у детей в странах Африки к югу от Сахары было выше, чем в других регионах мира, вследствие чего данный регион в 2019 г. был признан ВОЗ регионом с самым тяжелым бременем ВИЧ-ассоциированного ТБ (86% больных ТБ имели антитела к ВИЧ)⁴.

В работе А.А. Яковлева и соавт. было доказано, что риск заболевания ТБ детей с перинатальной ВИЧ-инфекцией в 42 раза выше, чем детей, родившихся от матерей с отрицательным ВИЧ-статусом [19].

Согласно данным зарубежных авторов был установлен факт заражения ТБ ВИЧ-инфицированных детей при семейном контакте со взрослыми (родители, бабушки, дедушки), которые были инфицированы ТБ, в 30–50% случаев [8]. Е.П. Еременко и соавт. выявили, что основным фактором риска развития ТБ у детей был контакт с больным ТБ, причём у детей с ВИЧ-инфекцией контакт был в 2 раза чаще, чем в группе детей с отрицательным ВИЧ-статусом, — 80,76 и 42,0% [20].

В нашем исследовании при анализе факторов риска инфицирования ТБ детей, перинатально экспонированных ВИЧ и ВИЧ-инфицированных, также было подтверждено, что частота их контакта с больным ТБ была выше, чем детей контрольной группы, что подтверждает данные, полученные другими авторами [8, 20].

При этом родители детей анализируемых групп, в отличие от родителей детей контрольной группы, имели низкий уровень социальной ответственности, т.к. продолжали употреблять инъекционные наркотики и были носителями вирусов гемоконтактных гепатитов, что мы считаем неблагоприятными условиями для распространения ТБ. Наши результаты подтверждают исследования, проведённые в Санкт-Петербурге, где наркозависимость и алкоголь-

⁴ ВОЗ. Информационный бюллетень о туберкулезе от 14.10.2020. URL: <https://www.who.int/ru/news-room/factsheets/detail/tuberculosis>

Таблица 4. Факторы риска заболевания ТБ детей исследуемых групп

Table 4. Risk factors for TB in children in the study groups

Факторы риска Risk factors	Экспонированные ВИЧ HIV-exposed (n = 216) 1		ВИЧ-инфицированные HIV-infected (n = 121) 2		Контрольная группа Control group (n = 100) 3		χ^2 Пирсона Pearson (p)	RR (95% ДИ) Relative risk (95% CI)
	абс. abs.	%	абс. abs.	%	абс. abs.	%		
Не вакцинированы в родильном доме Not vaccinated at the maternity hospital	142	65,7	47	38,8	18	18,0	62,3 ($p_{1-3} < 0,001$) 11,0 ($p_{2-3} < 0,001$)	RR ₁₋₃ = 1,9 (1,6–2,2) RR ₂₋₃ = 1,5 (1,2–1,9)
Контакт с больным ТБ Contact with a TB patient	22	10,2	58	47,9	–	–	61,0 ($p_{1-2} < 0,001$) 11,0 ($p_{1-3} < 0,001$) 65,0 ($p_{2-3} < 0,001$)	RR ₂₋₁ = 3,0 (2,3–3,8)
Мать и отец, потребляющие инъекционные наркотики Mother and father are injecting drug users (1 — n = 160, 2 — n = 121)	74	46,3	67	55,4	0	0	2,3 ($p_{1-2} = 0,1$)	RR ₁₋₂ = 0,9 (0,7–1,0)
Мать и отец с вирусом гепатита Mother and father with hepatitis virus	94	58,8	59	48,8	2	20,0	2,3 ($p_{1-2} < 0,1$) 85,1 ($p_{1-3} < 0,001$) 61,4 ($p_{2-3} < 0,001$)	RR ₁₋₂ = 1,2 (1,0–1,4) RR ₁₋₃ = 2,4 (2,0–2,9) RR ₂₋₃ = 2,5 (2,1–3,3)

Таблица 5. Сравнительная характеристика факторов риска развития ТБ у детей с ВИЧ-инфекцией

Table 5. Comparative characteristics of risk factors for the development of TB in children with HIV infection

Анализируемые параметры Analyzed parameters	Дети с коинфекцией ВИЧ + ТБ Children coinfecting with HIV + TB (n = 61)		Дети с ВИЧ-инфекцией Children with HIV infection (n = 60)		χ^2 Пирсона Pearson (p)	Отношение шансов (95% ДИ) Odds ratio (95% CI)
	абс. abs.	%	абс. abs.	%		
Конкордантные пары Concordant couples	37	72,5	29	64,4	0,7 (p = 0,4)	1,5 (0,6–3,5)
Мать и отец, потребляющие инъекционные наркотики Mother and father are injecting drug users	38	62,3	29	48,3	2,4 (p = 0,1)	1,8 (0,9–3,6)
Мать и отец с вирусом гепатита Mother and father with viral hepatitis	25	41,0	34	56,7	3,0 (p = 0,08)	0,5 (0,3–1,1)
Контакт с больным ТБ в семье Household contact with TB patient	44	72,1	13	21,7	30,9 (p < 0,001)	9,4 (4,1–21,5)
Наличие профилактики ВИЧ от матери к ребенку Prevention of mother-to-child transmission of HIV	24	39,3	29	48,3	1,0 (p = 0,3)	1,2 (0,8–1,8)
Отсутствие вакцинации против ТБ Lack of vaccination against TB	34	55,7	27	45,0	1,4 (p = 0,2)	0,8 (0,5–1,2)
Возраст постановки диагноза ВИЧ-инфекции старше 1 года Diagnosis of HIV infection at the age over 1 year	29	47,5	15	21,7	6,6 (p = 0,01)	2,7 (1,3–5,9)
Тяжелая иммуносупрессия в момент постановки диагноза ВИЧ-инфекции* Severe immunosuppression at the time of diagnosis of HIV infection*	33	54,1	15	25,0	10,7 (p = 0,002)	3,5 (1,6–7,6)
Сроки назначения ВААРТ более 6 мес от момента постановки диагноза ВИЧ-инфекции The administration of HAART is started more than 6 months later after the date of diagnosis of HIV infection (n = 57)	37	64,9	9	15,8	28,6 (p < 0,001)	8,7 (3,6–21,0)

Примечание. *У детей с коинфекцией ВИЧ + ТБ: СД4 — 11,0% (< 5 лет), 27 клеток/мкл (> 5 лет); у детей с ВИЧ-инфекцией: СД4 — 19,5% (< 5 лет), 3 клетки/мкл (> 5 лет).

Note. Children coinfecting with HIV + TB: CD4 — 11,0% (< 5 years), 27 cells/ μ l (> 5 years); children with HIV infection: CD4 — 19,5% (< 5 years), 3 cells/ μ l (> 5 years).

Таблица 6. Коэффициенты логистической регрессии**Table 6.** Logistic regression coefficients

Переменные уравнения Variable equations	Коэффициенты регрессии Regression coefficients	Среднеквадратичная ошибка Root mean square error	χ^2 Вальда Wald	Уровень значимости Significance level
Вакцинация против ТБ Vaccination against TB	-0,215	1,067	0,041	0,840
Мать и отец, потребляющие инъекционные наркотики Mother and father are injecting drug users	0,184	0,883	0,044	0,835
Мать и отец с вирусом гепатита Mother and father with viral hepatitis	-2,483	1,004	6,119	0,013
Конкордантность пар по ВИЧ HIV concordant couples	0,504	0,813	0,384	0,535
Наличие профилактики ВИЧ от матери к ребенку Prevention of mother-to-child transmission of HIV	0,510	1,282	0,158	0,691
Поздняя диагностика ВИЧ-инфекции Late diagnosis of HIV infection	2,570	1,226	4,397	0,036
Контакт с больным ТБ в семье Household contact with TB patient	4,158	0,975	18,181	0,0001
Тяжелая иммуносупрессия в момент постановки диагноза Severe immunosuppression at the time of diagnosis of HIV infection	2,673	0,917	8,504	0,004
Назначения ВААРТ позже 6 мес от момента постановки диагноза ВИЧ-инфекции ($n = 57$) The administration of HAART is started more than 6 months later after the date of diagnosis of HIV infection ($n = 57$)	3,655	1,026	12,695	0,0001
Константа Constant	-5,137	1,711	9,014	0,003

Примечание. Значение правильной классификации — 52,4; значение теста согласия — 11,7.

Note. Meaning of correct classification — 52,4; consent test value — 11,7.

Таблица 7. Заболеваемость ТБ у детей с ВИЧ-инфекцией в отдельных возрастных группах**Table 7.** The incidence of TB in children with HIV infection in certain age groups

Возраст, лет Age, years	Всего детей All children	Привитость против ТБ Vaccination against TB			
		привит vaccinated		не привит non vaccinated	
		абс. abc.	%	абс. abc.	%
< 1	3	0	0	3	10
1–2	18	11	61,1	7	38,9
3–6	19	7	36,8	12	63,2
7–14	20	15	75,0	5	25,0
15–17	1	1	100	0	0
Итого Total	61	34	55,7	27	44,3

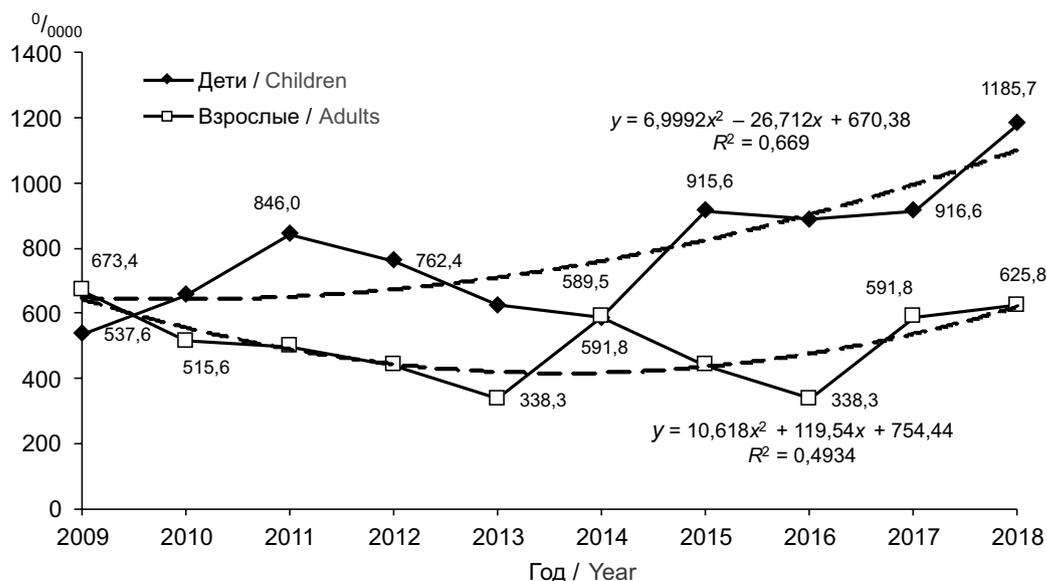
лизм родителей регистрировали у 85% детей с ТБ и ВИЧ-инфекцией, в то время как в группе детей без ВИЧ-инфекции — в 22% случаев ($p = 0,02$) [21].

В нашем исследовании контакт с больным ТБ у ВИЧ-инфицированных детей в семье был в 4,7 раза чаще, чем у детей, перинатально экспонированных

ВИЧ ($p < 0,001$). Фактором риска развития ТБ у детей из перинатального контакта было проживание в очаге ТБ, где оба родителя были ВИЧ-инфицированными (RR 5,3; 95% ДИ 1,7–21,7), и отсутствие прививки БЦЖ. Установлено, что у детей исследуемых групп, не вакцинированных против ТБ в родильном доме, шансы заболевания ТБ были в 1,7 и 1,9 раза выше по сравнению с таковыми в контрольной группе.

Доказано, что у ВИЧ-инфицированных детей резистентность к ТБ зависела от исходного уровня иммуносупрессии, темпов прогрессирования ВИЧ-инфекции и её стадии [22]. В исследовании Н.В. Эйсмонт особенностей клинического течения ТБ у детей с ВИЧ-инфекцией на территории Свердловской области в 2004–2012 гг. установлено, что вероятность развития ТБ у детей с отрицательным ВИЧ-статусом была ниже, чем у детей с поздними стадиями ВИЧ-инфекции ($p < 0,001$) [9].

В нашем исследовании одним из независимых факторов развития ТБ у ВИЧ-инфицированных детей были поздняя постановка диагноза ВИЧ-инфекции и поздно начатая ВААРТ на фоне сформировавшейся тяжелой иммуносупрессии. При сравнительной оценке иммунных нарушений в момент постановки диагноза у детей с ВИЧ-инфекцией до-



Заболееваемость контактных детей и взрослых в очагах ТБ в Свердловской области в 2009–2018 гг.
Morbidity of contact children and adults in the foci of TB in the Sverdlovsk region in 2009–2018.

ля лиц с выраженным иммунодефицитом в группе с сочетанной инфекцией была 2,2 раза выше и составляла 54,1% против 25,0% при моноинфекции, что показано ранее и другими авторами. В метаанализе P.J. Dodd и соавт. на примере 64 когорт детей с ТБ и ВИЧ-инфекцией установлено, что у детей с тяжелой формой иммуносупрессии заболеваемость ТБ была в 5 раз выше (95% ДИ 4,0–6,0), чем при отсутствии таковой [12].

В исследовании, проведенном на территории Приморского края, показано, что среди больных ТБ детей с перинатальной ВИЧ-инфекцией преобладали пациенты со стадией 4А (61,2%); 23,5% детей имели стадию 4Б, тогда как в когорте детей без ТБ таких было только 6% [19].

В нашем исследовании было показано, что более раннее от момента постановки диагноза начало ВААРТ снижает риски инфицирования ТБ в 2,1 раза, что подтверждается и в других исследованиях. Доказано, что у детей с ВИЧ-инфекцией, получающих ВААРТ, заболеваемость ТБ была ниже (OR = 0,30; 95% ДИ 0,21–0,39), чем у детей, не получающих ВААРТ [12]. После начала ВААРТ заболеваемость ТБ снижалась в течение 12 мес до OR 0,10 (95% ДИ 0,04–0,25) [12].

Выводы

Факторами риска развития ТБ у детей, перинатально экспонированных ВИЧ, являются контакт с больным активной формой ТБ в семье, конкордантность по ВИЧ-инфекции у родителей и несвоевременная вакцинация против ТБ или её отсутствие.

Предикторами заболевания ТБ у детей с ВИЧ-инфекцией можно считать контакт с больным ТБ в семье, позднюю постановку диагноза ВИЧ-ин-

фекции, тяжёлую иммуносупрессию, назначение ВААРТ позже 6 мес от момента постановки диагноза и девиантное поведение родителей.

Из коррекционных мероприятий основными считаем раннюю диагностику ВИЧ-инфекции и своевременное назначение ВААРТ, а также разобщение с источником инфекции и вакцинацию против ТБ в сроки, соответствующие Национальному календарю профилактических прививок Российской Федерации.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Marais V.J., Simon H.S., Graham S.M. Child health and tuberculosis. *Lancet Respir. Med.* 2014; 2(4): 254–6. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(14\)70009-8](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(14)70009-8)
2. WHO. Global Tuberculosis Report 2020. Geneva; 2020.
3. Нецаева О.Б. Эпидемическая ситуация по туберкулезу в России. *Туберкулёз и болезни лёгких.* 2018; 96(8): 15–24. <https://doi.org/10.21292/2075-1230-2018-96-8-15-24>
4. Цыбикова Э.Б., Пунга В.В., Русакова Л.И. Туберкулёз, сочетанный с ВИЧ-инфекцией, в России: статистика и взаимосвязи. *Туберкулёз и болезни лёгких.* 2018; 96(12): 9–17. <https://doi.org/10.21292/2075-1230-2018-96-12-9-17>
5. Цыбикова Э.Б., Владимиров А.В. Новые подходы к организации мониторинга смертности от ВИЧ-инфекции и туберкулеза. *Социальные аспекты здоровья.* 2020; 66(2): 11. <https://doi.org/10.21045/2071-5021-2020-66-2-11>
6. Скорняков С.Н., Чугаев Ю.П., Камаева Н.Г., Чарыкова Г.П., Долматова И.А. Клинико-эпидемиологические особенности туберкулёза у ВИЧ инфицированных детей Свердловской области. *Уральский медицинский журнал.* 2013; (2): 116–20.
7. Borraccino A., Migliore E., Piccioni P., Baussano I., Carosso A., Bugiani M. Yield of tuberculosis contact investigation in a low-incidence country. *J. Infect.* 2014; 68(5): 448–54.
8. Lamb G.S., Starke J.R. Tuberculosis in infants and children. *Microbiol. Spectrum.* 2017; 5(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.tnmi7-0037-2016>
9. Эйсмонт Н.В., Попкова Г.Г., Подымова А.С. Заболеваемость и особенности клинического течения туберкулёза у детей

- с ВИЧ-инфекцией в Свердловской области. *Туберкулёз и болезни лёгких*. 2014; 91(6): 35–41.
10. Fry S.H.L., Barnabas S.L., Cotton M.F. Tuberculosis and HIV – An update on the “Cursed Duet” in children. 2019; (7): 159. <https://doi.org/10.3389/fped.2019.00159>
 11. Mukuku O., Mutombo A.M., Kakisingi C.N., Musung J.M., Wembonyama S.O., Luboya O.N. Tuberculosis and HIV co-infection in Congolese children: risk factors of death. *Pan. Afr. Med. J.* 2019; 33: 326. <https://doi.org/10.11604/pamj.2019.33.326.18911>
 12. Dodd P.J., Prendergast A.J., Beecroft C., Kampmann B., Seddon J.A. The impact of HIV and antiretroviral therapy on TB risk in children: a systematic review and meta-analysis. *Thorax*. 2017; 72(6): 559–75. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2016-209421>
 13. Аксёнова В.А., Клевно Н.И., Кавтарашвили С.М. Очаг туберкулёзной инфекции и его значение в развитии туберкулёза у детей. *Туберкулёз и болезни лёгких*. 2015; (1): 19–24.
 14. Бондарь С.Н., Ключарева А.А. Состояние здоровья детей, рождённых от ВИЧ инфицированных матерей. *Вестні нацыянальнай акадэміі навук Беларусі*. 2013; (2): 70–4.
 15. Дмитриева М.В. Комплексная оценка соматического здоровья и психофизического развития детей с перинатальным контактом по ВИЧ-инфекции, воспитывающихся в закрытых учреждениях. *Аспирантский вестник Приволжья*. 2014; (5-6): 36–8.
 16. Кольцова О.В., Сафонова П.В. Повышение приверженности к ВААРТ у ВИЧ инфицированных женщин и детей с учетом социальных и психологических факторов. Новые подходы. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2012; 4(1): 69–76.
 17. Левчук С.В. ВИЧ-инфицированные дети: социально педагогическая характеристика. *Социально-экономические явления и процессы*. 2012; (12): 456–60.
 18. Пышкина Т.В., Новичков Д.А., Турищева М.А., Аристанбекова М.С. Факторы риска во время беременности и в родах у женщин с ВИЧ-инфекцией. *Бюллетень медицинских интернет-конференций*. 2013; 3(2): 68.
 19. Яковлев А.А., Корнилов М.С., Бениова С.Н., Скляр Л.Ф., Скалий О.А., Ряховская И.А. и др. Туберкулёз у детей с перинатальной ВИЧ-инфекцией на территории Приморского края. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессия*. 2018; 10(1): 69–77. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2018-10-1-69-77>
 20. Еременко Е.П., Бородулин В.Е., Борисова О.В. Предикторы локальных форм туберкулёза у детей с ВИЧ-инфекцией. *Наука и инновации в медицине*. 2019; 4(2): 62–5. <https://doi.org/10.35693/2500-1388-2019-4-2-62-65>
 21. Азовцева О.В., Пантелеев А.М., Карпов А.В., Архипов Г.С., Вебер В.Р., Беляков Н.А. и др. Анализ медико-социальных факторов, влияющих на формирование и течение ко-инфекции ВИЧ, туберкулёза и вирусного гепатита. *Инфекция и иммунитет*. 2019; 9(5-6): 787–99. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2019-5-6-787-799>
 22. Abuogi L.L., Mwachari C., Leslie H.H., Shade S.B., Otieno J., Yienya N., et al. Impact of expanded antiretroviral use on incidence and prevalence of tuberculosis in children with HIV in Kenya. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2013; 17(10): 1291–7. <https://doi.org/10.5588/ijtld.12.0740>
- REFERENCES
1. Marais B.J., Simon H.S., Graham S.M. Child health and tuberculosis. *Lancet Respir. Med.* 2014; 2(4): 254–6. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(14\)70009-8](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(14)70009-8)
 2. WHO. Global Tuberculosis Report 2020. Geneva; 2020.
 3. Nechaeva O.B. Tb situation in Russia. *Tuberkulez i bolezni legkikh*. 2018; 96(8): 15–24. <https://doi.org/10.21292/2075-1230-2018-96-8-15-24> (in Russian)
 4. Tsybikova E.B., Punga V.V., Rusakova L.I. Tuberculosis with concurrent HIV infection in Russia: statistics and correlations. *Tuberkulez i bolezni legkikh*. 2018; 96(12): 9–17. <https://doi.org/10.21292/2075-1230-2018-96-12-9-17> (in Russian)
 5. Tsybikova E.B., Vladimirov A.V. New approaches to monitoring mortality from HIV infection and tuberculosis. *Social aspects of population health*. 2020; 66(2): 11. (in Russian) <https://doi.org/10.21045/2071-5021-2020-66-2-11>
 6. Skornyakov S.N., Chugaev Yu.P., Kamaeva N.G., Charykova G.P., Dolmatova I.A. Case report of pulmonary ossification. *Ural'skiy meditsinskiy zhurnal*. 2013; (2): 116–20. (in Russian)
 7. Borraccino A., Migliore E., Piccioni P., Baussano I., Carosso A., Bugiani M. Yield of tuberculosis contact investigation in a low-incidence country. *J. Infect.* 2014; 68(5): 448–54.
 8. Lamb G.S., Starke J.R. Tuberculosis in infants and children. *Microbiol. Spectrum*. 2017; 5(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.tnmi7-0037-2016>
 9. Eysmont N.V., Popkova G.G., Podymova A.S. Incidence and clinical features of tuberculosis in HIV-infected children in the Sverdlovsk region. *Tuberkulez i bolezni legkikh*. 2014; 91(6): 35–41. (in Russian)
 10. Fry S.H.L., Barnabas S.L., Cotton M.F. Tuberculosis and HIV – An update on the “Cursed Duet” in children. 2019; (7): 159. <https://doi.org/10.3389/fped.2019.00159>
 11. Mukuku O., Mutombo A.M., Kakisingi C.N., Musung J.M., Wembonyama S.O., Luboya O.N. Tuberculosis and HIV co-infection in Congolese children: risk factors of death. *Pan. Afr. Med. J.* 2019; 33: 326. <https://doi.org/10.11604/pamj.2019.33.326.18911>
 12. Dodd P.J., Prendergast A.J., Beecroft C., Kampmann B., Seddon J.A. The impact of HIV and antiretroviral therapy on TB risk in children: a systematic review and meta-analysis. *Thorax*. 2017; 72(6): 559–75. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2016-209421>
 13. Aksenova V.A., Klevno N.I., Kavtarashvili S.M. A tuberculosis infection focus and its value in the development of tuberculosis in children. *Tuberkulez i bolezni legkikh*. 2015; (1): 19–24. (in Russian)
 14. Bondar' S.N., Klyuchareva A.A. Health state of children born to HIV-infected mothers. *Vesti natsyonal'noy akademii nauk Belarusi*. 2013; (2): 70–4. (in Russian)
 15. Dmitrieva M.V. Complex assessment of somatic health and psychophysical development of children with perinatal HIV-infection contact brought up in closed institutions. *Aspirantskiy vestnik Privolzh'ya*. 2014; (5-6): 36–8. (in Russian)
 16. Kolt'sova O.V., Safonova P.V. Enhancing adherence to HAART among HIV-infected women and children with account of social and psychological factors: New approaches. *VICH-infektsiya i immunosupressii*. 2012; 4(1): 69–76. (in Russian)
 17. Levchuk S.V. HIV-infected children: social and pedagogical characteristic. *Sotsial'no-ekonomicheskie yavleniya i protsessy*. 2012; (12): 456–60. (in Russian)
 18. Pyskhina T.V., Novichkov D.A., Turishcheva M.A., Aristanbekova M.S. Risk factors during pregnancy and childbirth in women with HIV-infection. *Byulleten' meditsinskikh internet-konferentsiy*. 2013; 3(2): 68. (in Russian)
 19. Yakovlev A.A., Kornilov M.S., Beniova S.N., Sklyar L.F., Skaliy O.A., Ryakhovskaya I.A. Tuberculosis in children with perinatal HIV-infection on the territory of Primorsky Krai. *VICH-infektsiya i immunosupressiya*. 2018; 10(1): 69–77. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2018-10-1-69-77> (in Russian)
 20. Eremenko E.P., Borodulin V.E., Borisova O.V. Predictors of the local forms of tuberculosis in children with HIV-infection. *Nauka i innovatsii v meditsine*. 2019; 4(2): 62–5. <https://doi.org/10.35693/2500-1388-2019-4-2-62-65> (in Russian)

21. Azovtseva O.V., Panteleev A.M., Karpov A.V., Arkhipov G.S., Veber V.R., Belyakov N.A., et al. Analysis of medical and social factors affecting the formation and course of co-infection HIV, tuberculosis and viral hepatitis. *Infektsiya i immunitet*. 2019; 9(5-6): 787–99.
<https://doi.org/10.15789/2220-7619-2019-5-6-787-799>
(in Russian)

Информация об авторах

Кукаркина Вера Анатольевна[✉] — врач-эпидемиолог Областного центра профилактики и борьбы со СПИД, Екатеринбург, Россия; аспирант кафедры эпидемиологии, социальной гигиены и организации Госсанэпидслужбы УГМУ, Екатеринбург, Россия, verakukarkina@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9723-8116>

Голубкова Алла Александровна — д.м.н., проф., в.н.с. лаб. инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4812-2165>

Подымова Анжелика Сергеевна — д.м.н., главный врач Областного центра по профилактике и борьбе со СПИД, Екатеринбург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7345-0801>

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

Статья поступила в редакцию 29.07.2020;
принята к публикации 12.02.2021;
опубликована 10.03.2021.

22. Abuogi L.L., Mwachari C., Leslie H.H., Shade S.B., Otieno J., Yienya N., et al. Impact of expanded antiretroviral use on incidence and prevalence of tuberculosis in children with HIV in Kenya. *Int. J. Tuberc. Lung Dis*. 2013; 17(10): 1291–7.
<https://doi.org/10.5588/ijtld.12.0740>

Information about the authors

Vera A. Kukarkina[✉] — epidemiologist, Regional Centre for Prevention and Control of AIDS, Yekaterinburg, Russia; postgraduate student, Department of epidemiology, social hygiene and organization, Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russia, verakukarkina@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9723-8116>

Alla A. Golubkova — D. Sci. (Med.), Prof., leading researcher, Laboratory of infections associated with the provision of medical care, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4812-2165>

Anzhelika S. Podymova — D. Sci. (Med.), Chief physician, Regional Centre for Prevention and Control of AIDS, Yekaterinburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7345-0801>

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.

The article was submitted 29.07.2020;
accepted for publication 12.02.2021;
published 10.03.2021.

НЕКРОЛОГИ

Памяти Ханса-Дитера Кленка (25 июня 1938 года – 1 июня 2021 года)



На 84-м году жизни скончался выдающийся немецкий учёный-вирусолог, педагог и организатор науки Ханс-Дитер Кленк (Hans-Dieter Klenk).

Х.-Д. Кленк родился в семье известного биохимика Эрнста Кленка (Ernst Klenk). С 1958 по 1964 г. юноша изучал медицину и биохимию в Тюбингене (ФРГ), Вене (Австрия) и Кёльне (ФРГ), получив итоговую оценку *summa cum laude* — «с наивысшим отличием». На протяжении нескольких лет (1967–1970 гг.) молодой учёный работал приглашённым исследователем в лаборатории проф. Пурнелла У. Чоппина (Purnell W. Choppin) в Рокфеллеровском университете (Нью-Йорк, США). По возвращении на родину Ханс-Дитер Кленк был назначен в 1973 г. профессором С3 (экстраординарным) в Университете им. Ю. Либиха в Гиссене (ФРГ), а спустя 12 лет принял приглашение на должность профессора С4 (ординарного — наивысшего ранга) кафедры вирусологии Марбургского университета им. Филиппа (ФРГ). Одновременно Х.-Д. Кленк возглавил университетский институт вирусологии и оставался его директором до 2007 г.

Ханс-Дитер Кленк оказал решающее влияние на формирование университетской вирусологической школы, утвердив её международную ориентацию и обеспечив ей мировую известность. Под руководством профессора Кленка несколько поколений молодых учёных получили возможность реализовать свои научные интересы и впоследствии занять руководящие — научные и организаторские — должности как в ФРГ, так и за её пределами.

С именем Х.-Д. Кленка тесно связаны весьма успешные и плодотворные исследования вирусов

гриппа, в частности роли поверхностных белков гемагглютинина и нейраминидазы в патогенезе этой инфекции. В круг его научных интересов входили и проблемы, касающиеся возбудителей других зоонозных заболеваний, которые угрожают общественному здоровью. Работы учёного и его коллег легли в основу создания вакцин и противовирусных препаратов против вирусов Эбола, Марбурга и других эпидемиологически значимых патогенов. Профессор Кленк — один из основателей самостоятельного исследовательского направления по изучению новых, или эмерджентных, вирусов, активно развивающегося и в настоящее время.

В качестве президента Ханс-Дитер Кленк с 1999 по 2005 г. возглавлял Немецкое общество вирусологии, с момента основания сотрудничал в Фонде фон Беринга–Рентгена в Гессен-Марбурге (ФРГ) на посту вице-президента. Он координировал деятельность многочисленных научных консорциумов, включая Центр совместных исследований Немецкого исследовательского фонда (Deutsche Forschungsgemeinschaft, DFG); являлся председателем ряда консультативных советов исследовательских институтов: Георг-Шпейер-Хаус (Georg-Spreyer-Haus), Фонда англо-германского научного обмена Фельдберга, Института медицинской микробиологии Фуданьского университета (Шанхай, КНР). Х.-Д. Кленк состоял членом многих национальных и международных научных организаций (Немецкое общество гигиены и микробиологии, Американское общество по вирусологии, Американское общество вирусологии и др.).

Ханс-Дитер Кленк удостоился множества почётных наград, среди которых — золотая медаль Роберта Коха, медаль Эрнста Юнга в области медицины и премия Эмиля фон Беринга. Он также был награждён Федеральным орденом «За заслуги перед Федеративной Республикой Германия» 1 степени (2018 г.).

Личность Кленка отличали удивительные проницательность и точность. Он пользовался особым рода авторитетом — естественным, присущим ему, как казалось, от природы. Его уход стал двойной потерей: мы скорбим по замечательному учёному, который до последних дней оставался прекрасным советчиком, и по нашему другу, последовательному и великодушному человеку, обращённому в будущее.

Профессор Ханс-Дитер Кленк был убеждённым сторонником развития сотрудничества между учёными ФРГ и России. Он выступал координатором российско-германского форума «Кох–Мечников» (2008–2010 гг.), организация которого проходила под личным патронажем Президента РФ В.В. Путина и Федерального канцлера Германии

А. Меркель. На протяжении многих лет Х.-Д. Кленк входил в состав Редакционного совета российского журнала «Вопросы вирусологии», а также других профильных медицинских изданий.

Светлая память об учёном и человеке Х.-Д. Кленке будет жить в наших сердцах, а его научные идеи продолжатся в работах вирусологов по всему миру.

*Жирнов О.П., член-корреспондент РАН
Львов Д.К., академик РАН*

Памяти Людмилы Павловны Зуевой (16 февраля 1939 года – 17 июня 2021 года)



Ушла из жизни Людмила Павловна Зуева, профессор, доктор медицинских наук, ум и душа кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова, которой она заведовала более четверти века, с 1991 года.

Людмила Павловна — заслуженный работник высшей школы РФ, заслуженный деятель науки РФ, почетный доктор Университета. Продолжительное время являлась проректором по последипломному образованию Санкт-Петербургской государственной медицинской академии им. И.И. Мечникова, трудилась в должности декана медико-профилактического факультета СЗГМУ им. И.И. Мечникова. Более 25 лет была главным эпидемиологом Комитета здравоохранения Администрации Санкт-Петербурга, являлась главным эпидемиологом Мини-

стерства здравоохранения РФ по Северо-Западному федеральному округу.

Людмила Павловна была человеком большого творческого потенциала, огромных организаторских способностей, глубокий теоретик и практик эпидемиологии. Людмила Павловна большую часть своей профессиональной жизни посвятила проблемам эпидемиологии и профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, являлась создателем первой в России школы госпитальных эпидемиологов. Высокие достижения в области госпитальной эпидемиологии позволили кафедре эпидемиологии стать ресурсным Центром глобальной сети ВОЗ по профилактике и контролю инфекций.

Под руководством профессора Л.П. Зуевой активно начала развиваться молекулярная эпидемиология. Была создана и успешно функционирует школа специалистов по изучению антибактериальных свойств бактериофагов в условиях глобального роста устойчивости микроорганизмов к антибиотикам.

Людмила Павловна воспитала целую плеяду специалистов высшей квалификации по вопросам профилактической медицины и эпидемиологии. Она является автором множества фундаментальных трудов, учебников, методических и учебных пособий, статей по широкому кругу вопросов эпидемиологии.

Уход Людмилы Павловны — это большая утрата не только для её семьи и коллег, но и для всей российской науки и медицины.

Светлая память о Людмиле Павловне навсегда сохранится в сердцах её коллег и соратников.

*Коллеги, редакционная коллегия и редакция
«Журнала микробиологии,
эпидемиологии и иммунобиологии»*

ЮБИЛЕИ

К 90-летию юбилею академика РАН Дмитрия Константиновича Львова



Выдающемуся советскому и российскому вирусологу, академику РАН Дмитрию Константиновичу Львову 26 июня 2021 года исполняется 90 лет.

Лидер отечественной вирусологии Д.К. Львов открыл новое научное направление в российской медицинской вирусологии — экологию вирусов. Им разработана оригинальная концепция циркуляции арбовирусов в различных климатических зонах мира и на её основе проведён анализ очагов вызываемых арбовирусами инфекций на территории СССР и Российской Федерации. Им был обнаружен новый тип циркуляции в Субарктике природных очагов арбовирусов, ассоциированных с морскими колониальными птицами и паразитирующими на них клещами, разработан уникальный метод экологического зондирования территории России и стран ближнего зарубежья.

Особое место в научном творчестве Д.К. Львова занимают комплексные исследования по биологической безопасности и проблеме новых и возвращающихся инфекций, а также широко распространённых социально значимых вирусных инфекций, для которых характерна высокая изменчивость генома возбудителя. Теоретические исследования Д.К. Львова были подтверждены собранными во время научных экспедиций биоматериалами, фундаментальный молекулярно-генетический анализ которых привёл к выделению более 40 новых для науки вирусов, в том числе особо опасных для человека. Благодаря этой работе, функционирующая на базе НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Государственная коллекция вирусов, статус которой

утвержден решением Правительства РФ, пополнилась более чем 250 вирусами человека, вызывающими эпидемические ситуации на территории России. Созданный Д.К. Львовым и соавторами уникальный «Атлас распространения возбудителей природно-очаговых инфекций на территории Российской Федерации» отражает циркуляцию возбудителей особо опасных и малоизученных вирусных инфекций в нашей стране и сегодня широко используется всеми региональными центрами гигиены и эпидемиологии, управлениями Роспотребнадзора и Россельхознадзора, противочумной службой, службами Министерства обороны, Министерства по чрезвычайным ситуациям, пограничными войсками России.

Дмитрий Константинович является признанным ведущим специалистом в области экологии и молекулярной эпидемиологии гриппа в нашей стране и в мире. Под его руководством проводятся исследования, направленные на прогнозирование и выявление эпидемических штаммов вируса гриппа. Д.К. Львовым были получены приоритетные данные о циркуляции вирусов гриппа А, в том числе эпидемических, с неизвестной ранее комбинацией поверхностных антигенов, среди птиц. Эти результаты послужили основой для разработки концепции об экологических связях между вирусами гриппа человека и птиц и участии вирусов гриппа животных в образовании новых эпидемических вирусов путём рекомбинации между вирусами человека и животных. Под руководством Д.К. Львова были изучены причины и последствия заноса птичьего вируса H5N1 в Северную Евразию, проникновение его в Россию и последствия пандемии и эволюции возбудителя, выделены новые варианты вирусов, созданы современные методы их выявления и генетического анализа, организован и осуществлялся непрерывный мониторинг за циркуляцией вирусов гриппа в разных регионах территории России.

Классик отечественной вирусологии и лидер в области проблем биобезопасности страны Д.К. Львов неоднократно избирался экспертом ВОЗ по гриппу, членом международного комитета по изучению вирусов в северных широтах, членом таксономических групп по бунья- и тогавирусам Международного комитета по таксономии вирусов, куратором (с российской стороны) исследований по экологии гриппа в рамках российско-американского

сотрудничества по гриппу, председателем Комитета по медицинским наукам и здравоохранению Тихоокеанской научной ассоциации, международным советником Американского национального комитета по изучению арбовирусов, членом редколлегии двух международных журналов. Обладая широкой научной эрудицией в области вирусологии, экологии вирусов, микробиологии, эпидемиологии и инфекционной патологии, Д.К. Львов много лет уделял научно-общественной и координационной работе, активно участвуя в создании и реализации государственных научных программ по актуальным проблемам вирусологии. На протяжении 26 лет Д.К. Львов являлся председателем Научного совета по вирусологии РАМН, заместителем председателя Координационного совета по проблемам птиц при биологическом отделении РАН, председателем

специализированного совета по защите диссертаций по вирусологии, эпидемиологии и инфекционным болезням, главным редактором журнала «Вопросы вирусологии», руководителем Центра экологии и эпидемиологии гриппа.

Академик РАМН Д.К. Львов является лауреатом Государственной премии Российской Федерации в области науки и технологий. Его многолетняя плодотворная научная и общественно-научная деятельность была высоко оценена правительством страны, он является лауреатом двух именных премий — имени первооткрывателя вирусов Д.И. Ивановского и имени академика В.Д. Тимакова, награждён орденом «Знак Почёта», орденом Ленина и орденом Почёта РФ.

От всей души поздравляем Дмитрия Константиновича со знаменательным 90-летним юбилеем!

*Редакционная коллегия
«Журнала микробиологии,
эпидемиологии и иммунологии»*