

4

ИЮЛЬ – АВГУСТ

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**

4

JULY – AUGUST

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)

4

ИЮЛЬ – АВГУСТ

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 prefix: 10.36233

Журнал открытого доступа,
не берущий плату за публикации.
Контент доступен под лицензией
Commons Attribution International
4.0 CC-BY.

Используется сервис CrossMark для
поддержания контента журнала
в актуальном состоянии и информирования
читателей об изменениях в опубликованных
статьях.

При публикации статьи на русском
и английском языках статья
размещается под одним DOI.
Переводы публикуются на сайте журнала.

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

SCOPUS, Russian Science Citation
Index (RSCI), интегрированная с
платформой Web of Science; DOAJ;
Ulrich's Periodicals Directory, ROAD;
EBSCO Publishing (на платформе
EBSCOhost); CrossRef; Dimensions.

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.](https://www.ebsco.com)

УЧРЕДИТЕЛИ:

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора
www.crie.ru
Всероссийское научно-практическое
общество эпидемиологов,
микробиологов и паразитологов

ИЗДАТЕЛЬ:

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

*Начальник редакционно-
издательского отдела:*
Осокина Ольга Владимировна

РЕДАКЦИЯ:

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

Заведующая редакцией:

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

К публикации принимаются только статьи,
подготовленные в соответствии с правили-
ми для авторов (www.microbiol.elpub.ru).

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

Подписано в печать 31.08.2021.
Формат 60×90^{1/8}. 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

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., член-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., член-корр. РАН, директор, НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва

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

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

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

Урываев Л.В., д.м.н., проф., член-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., член-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)

4

JULY – AUGUST

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 prefix: 10.36233

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

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

The CrossMark service is used.

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

The Journal is indexed by the following abstracting and indexing services:

SCOPUS, Russian Science Citation Index (RSCI) database, integrated in Web of Science; DOAJ; Ulrich's Periodicals Directory, ROAD; EBSCO Publishing (on the EBSCOhost platform); CrossRef; Dimensions.

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.](https://www.ebsco.com)

PUBLISHER:

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

EDITORIAL OFFICE:

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

Head of the Editorial and publishing department:

Olga V. Osokina

Head of Editorial Office:

Olga V. Ustinkova

The Editorial Board is not responsible for the advertising content.

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

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

Signed to the press on August 31, 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

- Попова А.Ю., Руженцова Т.А., Красовская Т.Ю., Албул К.В., Берил Н.В., Палади И.З., Гарбузов А.А., Хавкина Д.А., Чухляев П.В.**
Опыт международного сотрудничества в организации противоэпидемических мероприятий в условиях распространения COVID-19 на территории Республики Молдова* 373
- Яцышина С.Б., Мамошина М.В., Елькина М.А., Шаруха Г.В., Распопова Ю.И., Фольмер А.Я., Агапов К.А., Владимиров И.М., Зубарева О.В., Новикова И.С., Бондарева О.Б., Гиль В.А., Козловских Д.Н., Романов С.В., Диконская О.В., Пономарева А.В., Чистякова И.В., Кочнева Н.И., Юровских А.И., Кадникова Е.П., Килячина А.С., Лучинина С.В., Косарева Р.Р., Чиркова Г.Г., Валеуллина Н.Н., Лебедева Л.А., Детковская Т.Н., Аббасова Е.И., Романова О.Б., Пятыйрова Е.В., Акимкин В.Г.**
Распространённость возбудителей ОРВИ, гриппа и COVID-19 у лиц без симптомов респираторной инфекции* 384
- Aggarwal Sh., Parihari Sh., Banerjee A., Roy J., Banerjee N., Bankar R., Kumar S., Choudhury M., Shah R., Bhojak Kh., Palanivel V., Salkar A., Agrawal S., Shrivastav O., Shastri J., Srivastava S.**
Metabolome and exposome profiling of the biospecimens from COVID-19 patients in India 397
- Журавлева О.А., Воейкова Т.А., Кулигин В.С., Дебабов В.Г.**
Микробный синтез и оценка бактерицидных свойств наночастиц сульфида кадмия 416
- Тапальский Д.В., Петровская Т.А., Козлов А.Е.**
Формирование *in vitro* устойчивости к колистину у карбапенеморезистентных грамотрицательных бактерий и её биологическая стоимость 426
- Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М., Водопьянов С.О., Писанов Р.В., Титова С.В.**
Оценка способности холерных вибрионов формировать биоплёнку на поверхности хитинового панциря речного рака 434
- Бумбали С., Серикова Е.Н., Семенов А.В., Останкова Ю.В., Валутите Д.Э., Щемелев А.Н., Зуева Е.Б., Балде Т.А.Л., Баимова Р.Р., Тотолян А.А.**
Значимость лабораторной диагностики парентеральных вирусных гепатитов в Гвинейской Республике* 440

ОБЗОРЫ

- Бавыкин А.С.**
Клеточный и молекулярный уровень стратегии COVID-19 по индукции иммунодефицита. Возможные терапевтические решения 450

НАУКА И ПРАКТИКА

- Асатрян М.Н., Герасимук Э.Р., Струков Д.Р., Шмыр И.С., Вехов А.О., Ершов И.Ф., Лабодин А.В., Ноздрачева А.В., Семенов Т.А., Народицкий Б.С., Пронин А.В.**
Разработка программных инструментов, основанных на мультиагентном моделировании и реализованных в геоинформационной системе нового поколения, для решения эпидемиологических задач 468

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Халтанова Н.М., Остяк А.С., Лукьянова С.В., Кузнецов В.И., Андреевская Н.М., Адамович С.Н., Ушаков И.А., Юденич С.В., Балахонов С.В.**
Сравнительная оценка гидролизатов как основы при конструировании питательной среды для культивирования *Listeria monocytogenes* 481

ЮБИЛЕИ

- Твердохлебова Т.И., Агафонова В.В.**
Зинаида Виссарионовна Ермольева — великий советский учёный-микробиолог и эпидемиолог 486

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

CONTENTS

ORIGINAL RESEARCHES

Popova A.Yu., Ruzhentsova T.A., Krasovskaya T.Yu., Albul K.V., Beril N.V., Paladi I.Z., Garbuzov A.A., Khavkina D.A., Chuhliaev P.V. Experience of international cooperation in developing epidemic control measures during COVID-19 spread in the Republic of Moldova*	373
Yatsyshina S.B., Mamoshina M.V., Elkina M.A., Sharukho G.V., Raspopova Yu.I., Folmer A.Ya., Agapov K.A., Vladimirov I.M., Zubareva O.V., Novikova I.S., Bondareva O.B., Gil V.A., Kozlovskikh D.N., Romanov S.V., Dikonskaya O.V., Ponomareva A.V., Chistyakova I.V., Kochneva N.I., Yurovskikh A.I., Kadnikova E.P., Kilyachina A.S., Luchinina S.V., Kosareva R.R., Chirkova G.G., Valeullina N.N., Lebedeva L.A., Detkovskaya T.N., Abbasova E.I., Romanova O.B., Pyatyrova E.V., Akimkin V.G. Prevalence of ARVI, influenza, and COVID-19 pathogens in individuals without symptoms of respiratory infection*	384
Aggarwal Sh., Parihari Sh., Banerjee A., Roy J., Banerjee N., Bankar R., Kumar S., Choudhury M., Shah R., Bhojak Kh., Palanivel V., Salkar A., Agrawal S., Shrivastav O., Shastri J., Srivastava S. Metabolome and exposome profiling of the biospecimens from COVID-19 patients in India	397
Zhuravliova O.A., Voeikova T.A., Kuligin V.S., Debabov V.G. Microbial synthesis and evaluation of bactericidal properties of cadmium sulfide nanoparticles	416
Tapalski D.V., Petrovskaya T.A., Kozlov A.E. Formation <i>in vitro</i> of colistin resistance in carbapenem-resistant Gram-negative bacteria and its biological cost	426
Menshikova E.A., Kurbatova E.M., Vodopyanov S.O., Pisanov R.V., Titova S.V. Evaluation of the ability of cholera vibrios to form a biofilm on the surface of the chitinous shell of a crayfish by real-time PCR	434
Boumbaly S., Serikova E.N., Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Valutite D.E., Schemeleev A.N., Zueva E.B., Balde T.A.L., Baimova R.R., Totolian A.A. Significance of parenteral viral hepatitis laboratory diagnostics in the Republic of Guinea	440
REVIEWS	
Bavykin A.S. Cell and molecular level of strategy of COVID-19 to induce immunodeficiency	450
SCIENCE AND PRACTICE	
Asatryan M.N., Gerasimuk E.R., Strukov D.R., Shmyr I.S., Vekhov A.O., Ershov I.F., Labodin A.V., Nozdracheva A.V., Semenenko T.A., Naroditsky B.S., Pronin A.V. Development of software tools based on multi-agent modeling and implemented in the new generation geographic information systems for solving epidemiological problems	468
SHORT COMMUNICATIONS	
Khaptanova N.M., Ostyak A.S., Lukyanova S.V., Kuznetsov V.I., Andreevskaya N.M., Adamovich S.N., Ushakov I.A., Yudenich S.V., Balakhonov S.V. Comparative evaluation of hydrolysates as a basis for the construction of a nutrient medium for the cultivation of <i>Listeria monocytogenes</i>	481
ANNIVERSARIES	
Tverdokhlebova T.I., Agafonova V.V. Zinaida Vissarionovna Ermolyeva — the great Soviet scientist-microbiologist and epidemiologist	486

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-125>



Опыт международного сотрудничества в организации противоэпидемических мероприятий в условиях распространения COVID-19 на территории Республики Молдова

Попова А.Ю.¹, Руженцова Т.А.^{2✉}, Красовская Т.Ю.³, Албул К.В.⁴, Берил Н.В.⁵, Палади И.З.⁵, Гарбузов А.А.⁶, Хавкина Д.А.², Чухляев П.В.²

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

²Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

³Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия;

⁴Министерство здравоохранения Приднестровской Молдавской Республики, Тирасполь, Республика Молдова;

⁵Республиканский центр гигиены и эпидемиологии Приднестровской Молдавской Республики, Тирасполь, Республика Молдова;

⁶Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Аннотация

Цель работы — определить факторы, способствующие распространению новой коронавирусной инфекции на территории Республики Молдова, и разработать план мероприятий по их устранению.

Материалы и методы. В мае 2020 г. экспертами Роспотребнадзора совместно с руководством учреждений, принимающих участие в организации и реализации мер, противодействующих распространению COVID-19, был проведён детальный анализ противоэпидемических и лечебных мероприятий в 10 медицинских организациях Республики Молдова. Была дана оценка эффективности предпринимаемых действий как в отдельных стационарах и лабораториях, так и в стране в целом.

Результаты. Имеющиеся подходы к лечению больных COVID-19 и лабораторной диагностике вполне соответствовали общепринятым, резерв коечного фонда и аппаратов для проведения искусственной вентиляции лёгких свидетельствовал об адекватности мероприятий. Тем не менее были установлены факторы, очевидно способствовавшие распространению инфекции, исключение которых могло прервать ряд путей передачи инфекции и тем самым улучшить эпидемическую ситуацию.

Заключение. Анализ результатов проводимых мероприятий позволяет наметить и реализовать пути для улучшения эпидемической ситуации на отдельных территориях. В результате проведённой совместной работы была приостановлена вспышка в Бендерском психоневрологическом интернате; предотвращены вспышки в других учреждениях закрытого типа; сократилась заболеваемость среди медицинских работников, а число новых случаев заболевания COVID-19 снизилось до 0–5 в сутки в летние месяцы в Приднестровской Молдавской Республике. К настоящему моменту стали понятны подходы, обеспечивающие снижение заболеваемости. Имеется высокая вероятность того, что опыт, приобретённый в борьбе с новой коронавирусной инфекцией, понадобится и в последующие годы при появлении новых вариантов различных возбудителей.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, новая коронавирусная инфекция, особо опасная инфекция, пандемия, противоэпидемические мероприятия, эпидемия

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: Попова А.Ю., Руженцова Т.А., Красовская Т.Ю., Албул К.В., Берил Н.В., Палади И.З., Гарбузов А.А., Хавкина Д.А., Чухляев П.В. Опыт международного сотрудничества в организации противоэпидемических мероприятий в условиях распространения COVID-19 на территории Республики Молдова. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(4):373–382.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-125>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-125>

Experience of international cooperation in developing epidemic control measures during COVID-19 spread in the Republic of Moldova

Anna Yu. Popova¹, Tatiana A. Ruzhentsova^{2*}, Tatiana Yu. Krasovskaya³, Kristina V. Albul⁴, Natalia V. Beril⁵, Inna Z. Paladi⁵, Alexander A. Garbuzov⁶, Daria A. Khavkina², Pavel V. Chuhliaev²

¹Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-being Surveillance Moscow, Russia;

²G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;

³Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia;

⁴Ministry of Health of Pridnestrovian Moldavian Republic, Tiraspol, Republic of Moldova;

⁵Republican Center of Hygiene and Epidemiology of Pridnestrovian Moldavian Republic, Tiraspol, Republic of Moldova;

⁶Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Abstract

The purpose of the study — to identify the factors contributing to the spread of the novel coronavirus infection within the territory of the Republic of Moldova and to develop measures aimed at their elimination.

Materials and methods. In May 2020, experts of Rospotrebnadzor (the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing), together with leading employees of institutions participating in planning and implementing measures aimed at prevention of COVID-19 spread, conducted a detailed analysis of epidemic control and curative measures in 10 healthcare organizations in the Republic of Moldova. They assessed the effectiveness of the undertaken actions in in-patient facilities, in laboratories, and in the country in general.

Results. The existing approaches to treatment of patients with COVID-19 and to laboratory diagnostics were in line with the common practices; the adequacy of measures was evidenced by the hospital bed capacity and the stock of artificial lung ventilation machines. In the meantime, the experts came across the factors that obviously contributed to the infection spread. Their elimination could intercept some paths of infection and improve the situation.

Conclusion. The analysis of the current measures and their results is important for planning and implementing actions aimed at improvement of the epidemic situation in different regions. The collaborative efforts helped slow down the outbreak in the Bender psychoneurological residential facility; outbreaks were prevented in other limited-access institutions; the incidence among healthcare workers decreased; the daily number of new COVID-19 cases decreased to 0–5 during the summer months in the Dniestrian Moldovan Republic. Presently, there is a clear picture of approaches that should be taken to decrease the incidence. Most likely, the experience obtained in the fight against the novel coronavirus infection will be of great use in future if any new variants of viruses emerge.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, novel coronavirus infection, especially dangerous infection, pandemic, epidemic control measures, epidemic

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: Popova A.Yu., Ruzhentsova T.A., Krasovskaya T.Yu., Albul K.V., Beril N.V., Paladi I.Z., Garbuzov A.A., Khavkina D.A., Chuhliaev P.V. Experience of international cooperation in developing epidemic control measures during COVID-19 spread in the Republic of Moldova. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunologii*. 2021;98(4):373–382.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-125>

Введение

В мае 2020 г. группа экспертов Роспотребнадзора совместно с сотрудниками медицинских учреждений Республики Молдова провела работу по организации и реализации противоэпидемических мероприятий, препятствующих распространению инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2.

Пандемия COVID-19 заставила провести тщательный анализ и во многих случаях коррек-

цию мероприятий, обеспечивающих безопасность пациентов и медицинского персонала в условиях распространения особо опасной инфекции. Появление нового возбудителя, способного быстро распространяться воздушно-капельным путём, с формированием заболевания, сопровождающегося тяжёлыми поражениями лёгких и других органов и систем организма, стало огромнейшей проблемой почти во всех странах мира. В 2020 г. ещё в первые

месяцы пандемии во время работы в стационарах и других лечебно-профилактических учреждениях было инфицировано большое количество медицинских работников. Немало зарегистрировано случаев с летальными исходами. Очевидно, что инфицированный медработник как в инкубационном периоде, так и в первые дни заболевания может становиться источником инфицирования для большого числа людей. Особо высок риск распространения инфекции в случаях бессимптомного носительства, неярко выраженной симптоматики при работе с пациентами неинфекционного профиля как в амбулаторном, так и в стационарном звене. Это стало одной из важнейших проблем в борьбе с COVID-19.

Заболеваемость среди медицинских работников была связана в первую очередь с особенностями нового вируса, о котором данных в первые месяцы было недостаточно из-за малого периода его изучения. Другой причиной стала неготовность служб здравоохранения большинства стран к резкому росту числа заболевших. Недостаточное количество боксированных палат, средств индивидуальной защиты, дезинфицирующих средств, оборудования для обеззараживания помещений и очистки воздуха, несовершенная система сортировки больных на этапе приёмного отделения с использованием общих залов способствовали распространению инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, среди медицинских работников и населения в целом.

Без учёта статистики по SARS-CoV-2, в Российской Федерации ежегодный экономический ущерб от инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, составляет 10–15 млрд руб. Реальный экономический ущерб существенно выше и может составлять 500–700 млрд руб. [1–2]. Новая коронавирусная инфекция существенно добавила нагрузку на экономику во всех странах мира.

Одной из первоочередных задач организации противоэпидемических мероприятий является обеспечение безопасности при осуществлении медицинской помощи.

Эпидемиологическая безопасность включает в себя несколько направлений:

- обеспечение эпидемиологической безопасности медицинских технологий;
- обеспечение эпидемиологической безопасности медицинского персонала;
- обеспечение эпидемиологической безопасности больничной среды;
- обеспечение эффективного микробиологического мониторинга;
- обеспечение эпидемиологической диагностики;
- подготовка квалифицированных кадров [3].

В России организация противоэпидемических мероприятий против COVID-19 была осуществлена

на основе ряда разработанных ранее предложений, правил и регламентов:

- Федерального закона от 30.03.1999 № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения»;
- СанПиН 2.1.3.2630-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность»¹ и других нормативно-методических документов;
- СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)»;
- Национальной концепции профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи²;
- Федеральных клинических рекомендаций по вопросам обеспечения эпидемиологической безопасности³;
- предложений (практических рекомендаций) по организации системы внутреннего контроля качества и безопасности медицинской деятельности в медицинской организации (стационаре), разработанных Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения⁴.

Разработанные нормативные документы обновлялись по мере накопления данных о возбудителе COVID-19.

Очевидно, что для успешной борьбы с эпидемией необходимы анализ получаемых результатов в каждом отдельном регионе и их синтез по имеющимся итогам. Опыт, накопленный в России в борьбе с эпидемией COVID-19, безусловно, мог быть полезен при организации противоэпидемических мероприятий в других странах.

Цель работы — определить факторы, способствующие распространению COVID-19 на территории Республики Молдова (РМ) и разработать план мероприятий по их устранению.

Материалы и методы

Перед экспертами учреждений Роспотребнадзора были поставлены задачи по оказанию консультативно-методической помощи специалистам РМ, в том числе Приднестровской Молдавской Респуб-

¹ Утверждены постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 08.05.2010 № 58, утратили силу с 01.01.2021 на основании постановления Главного государственного санитарного врача РФ от 24.12.2020 № 44.

² Утверждена Главным государственным санитарным врачом РФ 06.11.2011.

³ Утверждены Национальной ассоциацией специалистов по контролю инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, и согласованы с Профильной комиссией Министерства здравоохранения РФ по эпидемиологии.

⁴ Предложения (практические рекомендации) по организации системы внутреннего контроля качества и безопасности медицинской деятельности в медицинской организации (стационаре). М.; 2015. Available at: https://www.medixpo.ru/fileadmin/user_upload/content/pdf/pract_recom_org_vkk_i_bmd_v_mo.pdf

лики (ПМР), в организации и проведении противоэпидемических мероприятий, лабораторной диагностики новой коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, в лечении пациентов с COVID-19, соблюдении требований биологической безопасности. Для этого эксперты ознакомились с эпидемиологической ситуацией и особенностями реализации рекомендуемых мероприятий. Было обращено внимание на организацию выявления инфицированных и контактных лиц, а также особенности оказания медицинской помощи больным COVID-19. Проведена оценка соответствия реальным потребностям количества и качественных характеристик диагностического оборудования, медикаментов, средств индивидуальной защиты, дезинфицирующих средств.

На момент поступления официального запроса о необходимой помощи от специалистов России в РМ был зафиксирован рост ежедневного количества новых случаев COVID-19. На 08.05.2020 в стране было зарегистрировано 4605 случаев заражения (0,13% от общей численности населения), в том числе 574 (0,13%) — в ПМР. Из этих цифр видно, что поражённость населения на отдельной территории ПМР и в РМ в целом была сопоставимой. Ежедневное число новых случаев COVID-19 на территории ПМР увеличивалось (**рисунок**).

Поводом для разработки и организации дополнительных мероприятий была более высокая, чем в России, смертность: на тот момент в РМ от COVID-19 скончались 150 (3,3%) пациентов. Отмечена высокая заболеваемость и смертность среди медицинского персонала.

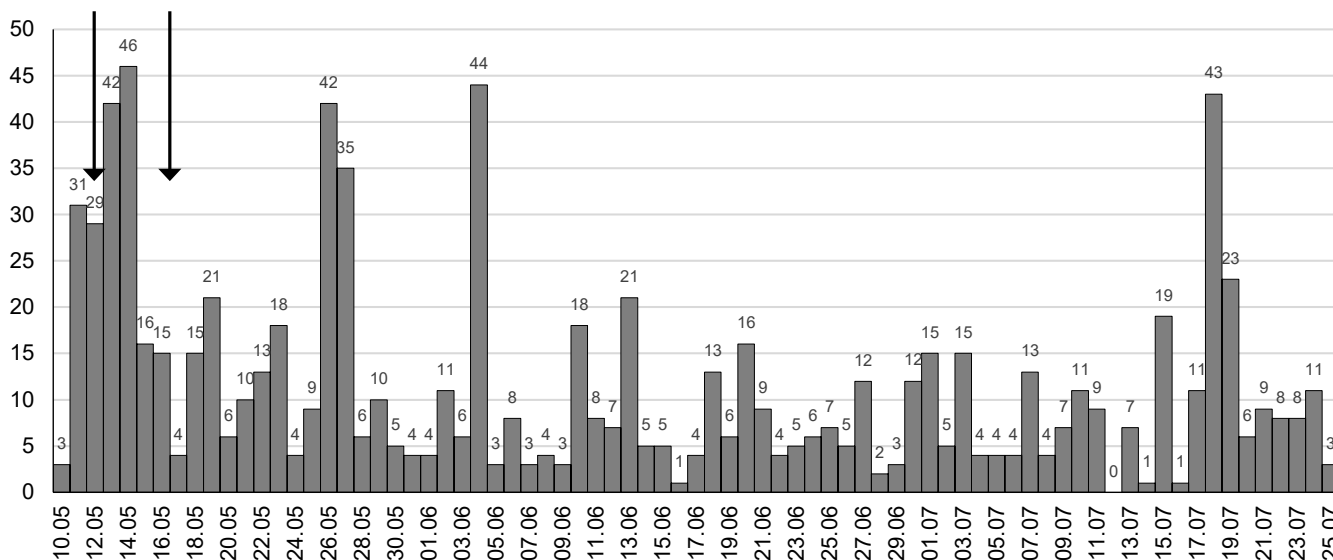
Для уточнения эпидемической ситуации, комплекса принятых мер и составления планов, направленных на стабилизацию и улучшение обстановки, были проведены встречи с руководством Национального агентства общественного здоровья и представителями ВОЗ.

Детальный анализ организации работы был проведен в 10 учреждениях, оказывавших помощь пациентам с COVID-19: в 7 стационарах (в 3 — в Кишиневе, в 2 — в Рыбницах, по 1 — в Тирасполе и Слободзее), в психоневрологическом интернате Бендеры, где находились больные COVID-19; а также в 2 лабораториях Тирасполя.

Во время посещения инфекционных и перепрофилированных для лечения больных COVID-19 учреждений специалисты Роспотребнадзора совместно с сотрудниками учреждений передвигались по маршрутам движения персонала в «зелёных» и «красных» зонах, участвовали в осмотрах и консультациях больных, оценивали особенности проводимых противоэпидемических мероприятий. В ходе работы были определены возможные источники инфицирования и на основании анализа возможностей предложены меры по их устранению.

Результаты

В беседе с руководством Национального агентства общественного здоровья и представителями ВОЗ было уточнено, что работа по различным направлениям эпиднадзора и профилактики завоза COVID-19 в РМ начаты с января 2020 г. в соответствии с имеющимися рекомендациями. Проведены перепрофилирование стационаров, подготовка ла-



Динамика ежедневного числа новых случаев COVID-19 на территории ПМР.

Стрелками выделен период работы экспертов Роспотребнадзора.

Источник: <https://novostipmr.com/ru/news/20-04-25/tempy-rasprostraneniya-covid-19-v-pridnestrove>

Dynamics of the daily number of new COVID-19 cases in DMR.

The arrows indicate the period of work of Rosпотребнадzor experts.

Source: <https://novostipmr.com/ru/news/20-04-25/tempy-rasprostraneniya-covid-19-v-pridnestrove>

бораторной сети и персонала (табл. 1). Осуществляется информирование граждан через средства массовой информации, с помощью листовок, постеров о необходимости соблюдения изоляции, использования масок, перчаток, дезинфицирующих средств при покупке товаров первой необходимости, контактировании с возможно инфицированными гражданами. Проведены закупка и распределение средств индивидуальной защиты (СИЗ), оборудования, антисептиков. С целью ограничения распространения инфекции в РМ приостановлена работа большинства учреждений, за исключением тех, которые задействованы в организации и проведении противоэпидемических мероприятий, лечении пациентов с COVID-19, обеспечении первоочередных потребностей населения. Приостановлена работа общественного транспорта. Осмотр улиц и мест общественного пользования позволил сделать заключение, что рекомендованные ограничения в полной мере выполняются гражданами.

В ходе уточнения особенностей лабораторной диагностики выявлено, что за сутки в РМ выполняется около 1500–1600 исследований, из них 350–1200 первичных. К концу первой декады мая выполнено около 25 тыс. исследований. Работает программа ВОЗ по контролю качества лабораторной диагностики. Основные обследуемые контингенты: лица с симптомами, характерными для COVID-19, с внебольничными пневмониями, имеется напряженность в отношении лиц старше 65 лет. Есть программа оценки риска инфицирования медработников в зависимости от степени контакта, но регулярного тестирования медработников, контактировавших с больными, не проводится, обследованию подлежат только лица, имеющие симптомы инфекционного заболевания. Больных в тяжёлом и среднетяжёлом состоянии, а также пожилых старше 65 лет, беременных женщин и детей немедленно госпитализируют. При лёгком течении и возможности изоляции в домашних условиях наблюдение и лечение осуществляются на дому. Имеется провизорный госпиталь, из которого после лабораторного подтверждения диагноза пациенты переводятся в специализированные отделения. Выписка пациентов из стационаров осуществляется после клинического излечения и одного отрицательного результата исследования мазков из респираторных путей на наличие РНК SARS-CoV-2. Исключение составляют беременные и дети, выписка которых производится после получения 2 отрицательных результатов.

После выписки пациент либо наблюдается в течение 14 дней дома под контролем семейного врача и под надзором полиции, либо переводится на долечивание в учреждение типа профилактория. Тактика выписки с одним отрицательным результатом помогает освободить койки для больных.

Отмечаются случаи повторной госпитализации таких больных.

Контактных лиц изолируют на дому. Взаимодействие с курирующим врачом осуществляется по телефону. Отмечено, что в стране обследование контактировавших с больными COVID-19 с целью выявления РНК SARS-CoV-2 проводится только при выявлении клинической симптоматики. Такой же подход применяется и в отношении медицинских работников.

В РМ имеется 430 аппаратов искусственной вентиляции лёгких (ИВЛ). В данный момент задействовано около 100, из них для больных COVID-19 — 29.

Техника лабораторной диагностики и имеющиеся подходы к лечению больных COVID-19 вполне соответствовали общепринятым согласно действующим рекомендациями эпидемиологов и ВОЗ (табл. 1), имеющийся резерв коечного фонда и аппаратов для ИВЛ свидетельствовал об адекватности мероприятий. Однако в ходе работы были выявлены факторы, которые могли способствовать распространению инфекции. Наибольшее количество недостатков в организации мероприятий, противодействующих распространению инфекции, было выявлено в стационарах и в организации профилактических мероприятий среди медицинских работников. Их исключение могло прервать ряд путей передачи и улучшить эпидемическую ситуацию.

При анализе условий оказания медицинской помощи инфицированным COVID-19 было обращено внимание на следующие факторы, которые могли становиться причинами инфицирования медицинского персонала и, как следствие, населения в целом:

1. Отсутствие в ряде учреждений специально оборудованных помещений (шлюзов) для медицинского персонала между «красной» и «зелёной» зонами для снятия и дезинфекции средств индивидуальной защиты после их использования.
2. Нехватка одноразовых СИЗ. Использование костюмов, масок, респираторов и очков, не обеспечивающих полноценной защиты органов дыхания, глаз и кожных покровов.
3. Недостаток готовых к применению дезинфицирующих средств для обеспечения полноценной дезинфекции использованных СИЗ и кожных покровов.
4. Отсутствие регулярного лабораторного обследования на COVID-19 медицинского персонала.
5. Отсутствие планового двукратного лабораторного обследования граждан, не имеющих симптомов респираторной инфекции, но контактировавших с инфицированными вирусом SARS-CoV-2.
6. Отсутствие герметичности помещений для работы с необеззараженным материалом, отсутствие разделения зоны разбора и первичной обработки материала с зоной для выделения нуклеино-

Таблица 1. Мероприятия по противодействию пандемии и наличие недостатков в их организации в РМ**Table 1.** Pandemic preventive measures and their detected shortcomings in RM

Объекты, контингенты Objects, groups of people	Проведённые мероприятия Implemented measures	Необходимость коррекции проведённых мероприятий Required rectification of the implemented measures
Население Population	1. Информирование 1. Communication of information	Нет No
	2. Изоляция, ограничение передвижений с возможностью выхода при необходимости по пропускам 2. Isolation, travel restriction, and only authorized essential errands	Нет No
	3. Рекомендации по использованию масок, перчаток, дезинфицирующих средств 3. Recommendations on the use of face masks, gloves, disinfectants	Нет No
Контактные лица Contacts	Изоляция Isolation	Да Yes
Пациенты с COVID-19 Patients with COVID-19	1. Лабораторное обследование методом ПЦР при подозрении 1. Laboratory testing by using PCR when infection is suspected	Нет No
	2. Изоляция на дому (при лёгких формах у лиц 18–65 лет) или в стационаре (остальной контингент) с выпиской при клиническом выздоровлении, одном отрицательном результате диагностики методом ПЦР с последующей изоляцией в течение 14 дней и наблюдением (other groups of people), after which patients can be discharged when they have clinically recovered, have negative results from the PCR test, and stay at home for 14 days under the doctor's supervision	Нет No
Образовательные учреждения Educational institutions	Закрываются Closed	Нет No
Транспорт Transport	1. Прекращение регулярного движения общественного транспорта 1. The scheduled operation of public transport is placed under lockdown	Нет No
	2. Выезд личного транспорта по пропускам 2. Authorized travel in personal vehicles	Нет No
	3. Прекращение регулярного железнодорожного и авиасообщения 3. Regular railway and air operations are on lockdown	Нет No
Магазины, учреждения и предприятия, места общественного пользования, парки, детские площадки Stores, institutions and factories, public areas, parks, playgrounds	Закрываются, за исключением магазинов, торгующих товарами первой необходимости, и учреждений, задействованных в противоэпидемических мероприятиях	Нет
	Closed, except for the stores selling basic consumer goods and the institutions participating in epidemic control measures	No
Стационары In-patient facilities	1. Перепрофилирование 1. Re-purposing	Да Yes
	2. Изменение потока пациентов 2. Changes in the patient flow	Да Yes
	3. Зонирование 3. Zoning	Да Yes
	4. Обеспечение дезинфицирующими средствами 4. Supply of disinfectants	Да Yes
	5. Обучение персонала 5. Training of personnel	Да Yes
Диагностические лаборатории Diagnostic laboratories	1. Дополнительно оборудованы 1. Equipped with additional new equipment	Да Yes
	2. Оснащение тест-системами 2. Equipped with test systems	Нет No
	3. Организация контроля качества по программе ВОЗ 3. WHO-program-based quality control	Нет No
Медицинские работники Healthcare workers	1. Обучение 1. Training	Да Yes
	2. Обеспечение СИЗ одноразового использования 2. Supply of disposable PPE	Да Yes
	3. Обеспечение СИЗ многоразового использования 3. Supply of reusable PPE	Нет No
	4. Обследование на наличие вируса SARS-CoV-2 в соответствии с оценённым риском, при наличии клинической симптоматики 4. Testing for SARS-CoV-2 in accordance with the assessed risk and in presence of clinical symptoms	Да Yes

вых кислот в некоторых переоборудованных для выявления вируса SARS-CoV-2 лабораториях.

7. Отсутствие ограничений общения подопечных психоневрологического интерната, в котором были выявлены случаи COVID-19. Отсутствие разграничения движения персонала между местами пребывания инфицированных или потенциально инфицированных и здоровых. Отсутствие адекватных СИЗ у некоторых сотрудников из числа обслуживающего персонала интерната.

8. Отсутствие отделений реанимации, оборудования для ИВЛ, компьютерной томографии в некоторых инфекционных стационарах с необходимостью транспортировки пациентов на другую территорию и в другие стационары в случаях ухудшения состояния или потребности в проведении дополнительной диагностики или терапии с использованием высокотехнологичного оборудования.

Во время работы использовались одноразовые наборы СИЗ. При обсуждении особенностей их применения уделялось особое внимание герметичности, соблюдению правил использования, дезинфекции, что обеспечивает безопасность медицинского персонала, снижая вероятность инфицирования до нулевых значений.

В соответствии с выявленными факторами, способствовавшими распространению инфекции, были предложены следующие решения (табл. 2):

1. Оборудовать во всех медицинских учреждениях, обеспечивающих диагностику и терапию COVID-19, специальные помещения (шлюзы) между «красной» и «зелёной» зонами для снятия и дезинфекции СИЗ медицинским персоналом после их использования. Очевидно, что необходимы обучение персонала и регулярный контроль за выполнением правил безопасного использования СИЗ.

2. Обеспечить персонал качественными одноразовыми, а при невозможности этого — многоразовыми СИЗ, обеспечивающими комфортную работу при полноценной защите органов дыхания, глаз, изоляции кожных покровов. Использовать полнолицевые маски со сменными фильтрующими элементами высокого уровня защиты (P2–3).

3. Обеспечить достаточное количество готовых растворов дезинфицирующих средств для обеспечения полноценной дезинфекции СИЗ после их применения и кожных покровов персонала. Рекомендовано использование бесконтактных сенсорных разбрызгивателей/дозаторов и бактерицидных ламп закрытого типа (рециркуляторов) для постоянного обеззараживания воздуха в шлюзах между «красной» и «зелёной» зонами.

4. Обеспечить регулярное (не реже 1 раза в неделю) лабораторное обследование на COVID-19 медицинского персонала с помощью метода ПЦР.

5. Обеспечить плановую двукратную лабораторную диагностику для выявления присутствия на

слизистых оболочках верхних дыхательных путей вируса SARS-CoV-2 среди граждан, не имеющих симптомов респираторной инфекции, но контактировавших с инфицированными лицами. Эти обследования целесообразно проводить в последние дни предполагаемого максимального инкубационного периода двукратно, с интервалом не менее 1 сут. В то же время выписку из стационара при улучшении клинического состояния с наличием лишь одного отрицательного результата диагностики методом ПЦР на присутствие вируса с целью освобождения коечного фонда можно считать вполне допустимой при условии жесткого соблюдения рекомендаций по изоляции и дезинфекции до получения второго отрицательного результата.

6. Обеспечить герметичность помещений для работы с необеззараженным материалом, а также разделение зон разбора и первичной обработки материала и зон для выделения нуклеиновых кислот (в соответствии с требованиями к помещениям ПЦР-лаборатории).

7. Организовать «красные» и «зелёные» зоны с шлюзами между ними и разграничением маршрутов движения персонала и подопечных в учреждениях закрытого типа, где выявлены больные и инфицированные вирусом SARS-CoV-2. Обеспечить адекватную дезинфекцию помещений, мебели, одежды, белья и имеющихся отходов. Обеспечить использование адекватных одноразовых или многоразовых СИЗ как медработниками, так и персоналом, обеспечивающим обслуживание лиц, проживающих в подобных учреждениях.

8. Уменьшить число случаев с необходимостью транспортировки пациентов на другие территории путём размещения инфицированных вирусом SARS-CoV-2 в стационарах, имеющих отделения реанимации и обученный медицинский персонал, наличие в корпусах и госпиталях для пациентов с COVID-19 оборудования, обеспечивающего своевременную диагностику и терапию (компьютерных томографов, аппаратов для экстракорпоральной мембранной оксигенации, аппаратов для ИВЛ, плазмафереза). С целью снижения числа случаев, при которых необходимо проведение повторной компьютерной томографии органов грудной клетки для выявления причин ухудшения состояния и уточнения степени поражения лёгочной ткани, было рекомендовано использование для аускультации лёгких электронных беспроводных фонендоскопов.

Важной составляющей противоэпидемических мероприятий является правильная организация осмотров и обследований пациентов с подозрением на COVID-19 или больных с установленным диагнозом, нуждающихся в дополнительном обследовании или лечении с использованием оборудования, находящегося в других отсеках, корпусах, на удалённых территориях. При невозможности исключить такую

Таблица 2. Выявленные в медицинских учреждениях РМ причины, способствующие распространению COVID-19, и мероприятия для их устранения**Table 2.** Factors leading to COVID-19 spread in RM healthcare institutions and measures aimed at their elimination

Причины распространения COVID-19 Factors leading to COVID-19 spread	Мероприятия по устранению причин Elimination measures
Отсутствие двукратной лабораторной диагностики для выявления на слизистых оболочках верхних дыхательных путей вируса среди граждан, не имеющих симптомов респираторной инфекции, но контактировавших с инфицированными Absence of double testing for detection of the virus on mucous membranes of the upper respiratory tract among people who do not have symptoms of respiratory infection, but who had contact with infected people	Обеспечить плановую двукратную лабораторную диагностику для выявления на слизистых оболочках верхних дыхательных путей вируса SARS-CoV-2 среди граждан, не имеющих симптомов респираторной инфекции, но контактировавших с инфицированными Regular two-time diagnostic tests for detection of the SARS-CoV-2 virus on mucous membranes of the upper respiratory tract among people who do not have symptoms of respiratory infection, but who had contact with infected people
Отсутствие оборудованных шлюзов для безопасного снятия СИЗ медперсоналом с возможностью полноценной дезинфекции Absence of properly equipped airlocks where healthcare personnel can take of their PPE and have it disinfected	Выделение оборудованных зон с достаточным количеством и объемом ёмкостей с дезинфицирующими средствами, установка оборудования для дезинфекции персонала жидкими дезинфицирующими средствами. Установка оборудования для обеззараживания воздуха (рециркуляторы). Маркировка и полноценная изоляция «красных» и «зелёных» зон Designated adequately equipped areas with the sufficient quantity of containers with disinfectants; installed disinfection equipment for personnel. Equipment for air disinfection (recirculators). Signage, marking, and proper insulation of red and green zones
Наличие вентиляционных решёток между зонами Ventilation grilles installed between the zones	Обеспечить герметичность перегородок и дверей между зонами Airtight partitions and doors between the zones
Отсутствие отделений реанимации, оборудования для ИВЛ, компьютерной томографии, другого высокотехнологичного оборудования в переоборудованных стационарах Absence of intensive care units, ALV equipment, computed tomography, other high-tech equipment in repurposed hospitals	Обеспечить наличие в корпусах и госпиталях для пациентов с COVID-19 оборудования (компьютерных томографов, аппаратов для экстракорпоральной мембранной оксигенации, аппаратов для ИВЛ, плазмафереза); при отсутствии томографа рекомендовано использование для аускультации лёгких электронных беспроводных фонендоскопов Availability of equipment (CT scanners, ECMO, ALV, and plasmapheresis machines) in hospitals for patients with COVID-19; electronic wireless stethoscopes for auscultation of lungs when the CT scanner is not available
Нехватка одноразовых СИЗ. Использование костюмов, масок, респираторов и очков, не обеспечивающих полноценной защиты органов дыхания, глаз и кожных покровов Shortage of disposable PPE. Using of clothing, face masks, respirators and eyewear, which do not provide proper protection of respiratory organs, eyes, and skin	Обеспечить персонал качественными одноразовыми или многоразовыми СИЗ, с полноценной защитой органов дыхания, глаз, изоляции кожных покровов. Использовать полнолицевые маски со сменными фильтрующими элементами высокого уровня защиты (P2–3) High-quality disposable or reusable PPE providing total protection of respiratory organs, eyes, and skin. Full face masks with replacement filters of high protection level (P2–3 rating)
Неправильное использование СИЗ и дезинфицирующих средств Improper use of PPE and disinfectants	Обучение медицинского персонала Training of healthcare workers
Отсутствие регулярной лабораторной диагностики для выявления присутствия на слизистых оболочках верхних дыхательных путей вируса среди медицинского персонала Absence of regular laboratory diagnostic tests among healthcare workers for detection of the virus on mucous membranes of the upper respiratory tract	Обеспечить регулярную (не реже 1 раза в неделю) лабораторную диагностику с помощью метода ПЦР для выявления присутствия на слизистых оболочках верхних дыхательных путей вируса среди медицинского персонала Regular (at least once a week) laboratory diagnostic PCR-based tests for healthcare personnel for detection of the virus on mucous membranes of the upper respiratory tract

процедуру следует обеспечить отсутствие контакта между здоровыми и больными, а также проводить тщательную дезинфекцию оборудования, помещений, транспорта, в которых находился пациент.

Обсуждение

Таким образом, были выявлены вероятные факторы распространения коронавирусной инфекции, исходя из предполагаемых особенностей возбудителя. Среди них необходимо в первую очередь учитывать вероятность присутствия вируса в аэро-

золе воздуха помещений, где находятся пациенты с COVID-19, возможность перемещения в соседние помещения, особенно при высоких концентрациях. Такими зонами следует считать в первую очередь отделения реанимации, где находится одновременно большое количество пациентов. Число инфицированного и заболевшего медперсонала из этих подразделений приближается к 100%. Крайне важно учитывать, что сотрудники учреждений могут быть бессимптомными носителями вируса и при этом распространять инфекцию через контакты в

нерабочее время: в местах общественного пользования, на улицах при скоплении людей и дома. Для прерывания этого пути необходимо обеспечивать регулярную лабораторную диагностику на наличие вируса среди персонала с отстранением от работы и проведением активной противовирусной терапии при положительном результате.

Большой ошибкой представляется исключение из числа лиц, подлежащих повторному регулярно обследованию, медперсонала, имеющего в анамнезе эпизод COVID-19. Циркуляция различных по антигенному составу штаммов, вероятность появления мутаций, вероятность повторного инфицирования или повторного выделения вируса спустя продолжительный период диктует необходимость исключения коронавирусной инфекции и у переболевших. Вместе с этим возможность передачи через одежду, кожные покровы, волосы контактным путём объясняет необходимость использования СИЗ вне зависимости от имеющегося анамнеза.

Безусловно, для снижения уровня циркуляции вируса следует проводить эффективную этиотропную терапию, которая приводит к элиминации вируса уже на 3-и сутки от момента начала лечения⁵. В противоположность этому имеющиеся данные исследований подтверждают, что при использовании малоэффективных противовирусных препаратов, лекарственных средств с неуточнённым механизмом действия или только патогенетической и симптоматической терапии время до элиминации вируса составляет 7–11 сут и более [5]. Продолжающееся выделение вируса пациентом создаёт риск инфицирования персонала, особенно новых сотрудников, передачи инфекции контактным или воздушно-капельным путём через персонал или после выписки пациента при положительной клинической динамике в отсутствие двукратного отрицательного результата лабораторной диагностики на наличие вируса, особенно при волнообразном течении с повторными периодами вирусывыделения.

По итогам анализа организации медицинской помощи больным новой опасной коронавирусной инфекцией был составлен перечень необходимого дополнительного оборудования, диагностических, дезинфицирующих и лекарственных средств. Проведены 3 конференции, на которых были представлены данные об особенностях вируса SARS-CoV-2, течения COVID-19, подходах к лечению и диагностике, имеющихся в России диагностических препаратах, методиках отбора проб биоматериала, требованиях биобезопасности.

⁵ Министерство здравоохранения Российской Федерации. Временные методические рекомендации. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 9 (26.10.2020). Available at: https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/052/550/original/MP_COVID-19_%28v9%29.pdf

Ситуация с инфекцией, вызванной вирусом SARS-COV-2, продемонстрировала необходимость анализа эффективности проводимых противоэпидемических мероприятий, своевременного выявления и устранения факторов, способствующих распространению инфекции. Безусловно, предугадать особенности нового возбудителя при внезапном его появлении с последующим стремительным распространением крайне сложно.

Заключение

Анализ результатов проводимых мероприятий позволяет наметить и реализовать пути для улучшения эпидемической ситуации на отдельных территориях. В итоге проведённой совместной работы была приостановлена вспышка в Бендерском психоневрологическом интернате; предотвращены вспышки в других учреждениях закрытого типа; сократилась заболеваемость среди медицинских работников, а число новых случаев заболевания COVID-19 снизилось в ПМП до 0–5 в сутки в летние месяцы. К настоящему моменту стали понятны подходы, обеспечивающие снижение заболеваемости. Имеется высокая вероятность того, что опыт, приобретённый в борьбе с новой коронавирусной инфекцией, понадобится и в последующие годы при появлении новых вариантов различных возбудителей. Безусловно, традиция межгосударственного взаимодействия в борьбе с вирусными инфекциями, начиная с ликвидации оспы и борьбы с полиомиелитом и заканчивая международными усилиями по мониторингу штаммов гриппа, обеспечивает возможности быстрого реагирования в вопросах мировой биологической безопасности.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Асланов Б.И., Зуева Л.П., Любимова А.В., Колосовская Е.Н., Долгий А.А., Осьмирко Т.В. Федеральные клинические (методические) рекомендации. Эпидемиологическое наблюдение за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи. М.; 2014.
2. Брусина Е.Б., Зуева Л.П., Ковалишена О.В., Стасенко В.Л., Фельдблюм И.В., Брико Н.И. и др. Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи: современная доктрина профилактики Часть 2. Основные положения. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2018; 17(6): 4–10. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-4-10>
3. Попова А.Ю. Эпидемиологическая безопасность — неотъемлемый компонент системы обеспечения качества и безопасности медицинской помощи. *Вестник Росздравнадзора*. 2017; (4): 5–8.
4. Брико Н.И., Брусина Е.Б., Зуева Л.П., Ковалишена О.В., Стасенко В.Л., Фельдблюм И.В. и др. Стратегия обеспечения эпидемиологической безопасности медицинской деятельности. *Вестник Росздравнадзора*. 2017; (4): 15–21.
5. Руженцова Т.А., Чухляев П.В., Хавкина Д.А., Гарбузов А.А., Плоскирева А.А., Осешнюк Р.А. и др. Эффективность и безопасность применения фавипиравира в комплексной терапии COVID-19 легкого и среднетяжелого течения. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2020; 4(9): 8–19. <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2020-9-00-4>

REFERENCES

- Aslanov B.I., Zueva L.P., Lyubimova A.V., Kolosovskaya E.N., Dolgiy A.A., Os'mirko T.V. Federal clinical (methodological) recommendations. Epidemiological surveillance of infections associated with the provision of medical care. Moscow; 2014. (in Russian)
- Brusina E.B., Zueva L.P., Kovalishena O.V., Stasenko V.L., Fel'dblyum I.V., Briko N.I., et al. Healthcare-associated infections: modern doctrine of prophylaxis. Part II. Basic concept. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2018; 17(6): 4–10. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-4-10> (in Russian)
- Popova A.Yu. Epidemiological safety is an integral component of the system for ensuring the quality and safety of medical care. *Vestnik Roszdravnadzora*. 2017; (4): 5–8. (in Russian)
- Briko N.I., Brusina E.B., Zueva L.P., Kovalishena O.V., Stasenko V.L., Fel'dblyum I.V., et al. The strategy of ensuring epidemiological safety of medical activity. *Vestnik Roszdravnadzora*. 2017; (4): 15–21. (in Russian)
- Ruzhentsova T.A., Chukhlyaev P.V., Khavkina D.A., Garbuzov A.A., Ploskireva A.A., Oseshnyuk R.A., et al. Efficacy and safety of favipiravir in the complex therapy of mild and moderate COVID-19. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie*. 2020; 4(9): 8–19. <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2020-9-00-0> (in Russian)

Информация об авторах

Попова Анна Юрьевна — д.м.н., проф., Главный государственный санитарный врач РФ, руководитель Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2567-9032>

Руженцова Татьяна Александровна — д.м.н., зам. директора МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия, ruzhenцова@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-6945-2019>

Красовская Татьяна Юрьевна — к.м.н., в.н.с. лаб. вирусологии отдела диагностики инфекционных болезней РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7663-5502>

Албул Кристина Валерьевна — министр здравоохранения Приднестровской Молдавской Республики, Тирасполь, Республика Молдова, <https://orcid.org/0000-0003-0839-027X>

Берил Наталия Васильевна — главный санитарный врач Приднестровской Молдавской Республики, главный врач Республиканского центра гигиены и эпидемиологии Приднестровской Молдавской Республики, Тирасполь, Республика Молдова, <https://orcid.org/0000-0002-7010-4572>

Палади Инна Зиновьевна — зам. главного врача Республиканского центра гигиены и эпидемиологии Приднестровской Молдавской Республики, Тирасполь, Республика Молдова, <https://orcid.org/0000-0002-4617-1417>

Гарбузов Александр Александрович — методист отдела клинических исследований ЦНИИ эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3378-8418>

Хавкина Дарья Александровна — м.н.с. клинического отдела, врач клинико-диагностического центра МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5919-9841>

Чухляев Павел Владимирович — м.н.с. научного клинико-диагностического отдела, врач клинико-диагностического центра МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1210-1215>

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 05.02.2021;
принята к публикации 05.05.2021;
опубликована 30.08.2021

Information about the authors

Anna Yu. Popova — D. Sci. (Med.), Professor, Main sanitary doctor of the Russian Federation, Head, Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-Being Surveillance, <https://orcid.org/0000-0003-2567-9032>

Tatiana A. Ruzhentsova — D. Sci. (Med.), Deputy Director, G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, ruzhenцова@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-6945-2019>

Tatiana Yu. Krasovskaya — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Department of diagnostics of infectious diseases, Sector of virology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7663-5502>

Kristina V. Albul — Minister of Health of the Pridnestrovian Moldavian Republic, Tiraspol, Republic Moldova, <https://orcid.org/0000-0003-0839-027X>

Natalia V. Beril — Main Health Officer of the Pridnestrovian Moldavian Republic, Republican Center of Hygiene and Epidemiology of the Pridnestrovian Moldavian Republic, Tiraspol, Republic Moldova, <https://orcid.org/0000-0002-7010-4572>

Inna Z. Paladi — Deputy Chief Physician, Republican Center of Hygiene and Epidemiology of the Pridnestrovian Moldavian Republic, Tiraspol, Republic Moldova, <https://orcid.org/0000-0002-4617-1417>

Alexander A. Garbuzov — methodist, Clinical research department, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3378-8418>

Daria A. Khavkina — junior researcher, Clinical department, doctor, Clinical and diagnostic center, G.N. Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5919-9841>

Pavel V. Chukhlyaev — junior researcher of the scientific clinical and diagnostic department, doctor of the clinical and diagnostic center, G.N. Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1210-1215>

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 05.02.2021;
accepted for publication 05.05.2021;
published 30.08.2021



Распространённость возбудителей ОРВИ, гриппа и COVID-19 у лиц без симптомов респираторной инфекции

Яцышина С.Б.¹, Мамошина М.В.¹, Елькина М.А.¹, Шарухо Г.В.², Распопова Ю.И.², Фольмер А.Я.³, Агапов К.А.⁴, Владимиров И.М.⁴, Зубарева О.В.⁵, Новикова И.С.⁵, Бондарева О.Б.⁵, Гиль В.А.⁵, Козловских Д.Н.⁶, Романов С.В.⁷, Диконская О.В.⁶, Пономарева А.В.⁶, Чистякова И.В.⁷, Кочнева Н.И.⁶, Юровских А.И.⁷, Кадникова Е.П.⁶, Киячина А.С.⁷, Лучинина С.В.⁸, Косарева Р.Р.⁸, Чиркова Г.Г.⁹, Валеуллина Н.Н.⁹, Лебедева Л.А.¹⁰, Детковская Т.Н.¹¹, Аббасова Е.И.¹¹, Романова О.Б.¹², Пятырова Е.В.¹², Акимкин В.Г.¹

¹Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

²Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Тюменской области, Тюмень, Россия;

³Центр гигиены и эпидемиологии в Тюменской области, Тюмень, Россия;

⁴Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербург, Санкт-Петербург, Россия;

⁵Управление Роспотребнадзора по Волгоградской области, Волгоград, Россия;

⁶Управление Роспотребнадзора по Свердловской области, Екатеринбург, Россия;

⁷Центр гигиены и эпидемиологии в Свердловской области, Екатеринбург, Россия;

⁸Управление Роспотребнадзора по Челябинской области, Челябинск, Россия;

⁹Центр гигиены и эпидемиологии в Челябинской области, Челябинск, Россия;

¹⁰Центр гигиены и эпидемиологии в Хабаровском крае, Хабаровск, Россия;

¹¹Управление Роспотребнадзора по Приморскому краю, Владивосток, Россия;

¹²Центр гигиены и эпидемиологии в Приморском крае, Владивосток, Россия

Аннотация

Введение. В распространении SARS-CoV-2 могут участвовать инфицированные, у которых отсутствуют или слабо выражены симптомы острой респираторной инфекции (ОРИ). Мониторинг с использованием методов амплификации нуклеиновых кислот позволяет определить распространённость возбудителей ОРИ и оценить эффективность профилактических мер.

Цели — определить распространённость возбудителей ОРИ вирусной этиологии, гриппа и COVID-19 среди лиц без симптомов ОРИ в возрастных группах, проследить изменение эпидемической ситуации путём мониторинга в еженедельном режиме возбудителей в межэпидемический и в начале традиционного эпидемического сезона ОРИ, оценить эффективность медицинских масок для профилактики этих инфекций.

Материалы и методы. С августа по октябрь 2020 г. в 26 регионах РФ обследовано с анкетированием 14 119 лиц (из них 4582 детей), не имевших симптомов ОРИ. Мазки из носо-ротоглотки тестировали наборами реагентов «АмплиСенс ОРВИ-скрин-FL», «АмплиСенс Influenza virus A/B-FL» и «АмплиСенс Cov-Bat-FL» (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва).

Результаты. Положительные результаты были получены в 11,1% исследованных образцов, превалировал риновирус (7,32%), SARS-CoV-2 обнаружен у 1,66%. Осенью доля случаев инфицирования SARS-CoV-2 выросла с 0,49 до 4,02% ($p < 0,001$). Концентрация РНК SARS-CoV-2 составляла до 10^{10} копий в 1 мл образца.

Выводы. Установлены различия распространённости SARS-CoV-2 и риновируса в возрастных группах и в динамике. Применение медицинских масок снижало риск инфицирования респираторными вирусами на 51%, риск заражения SARS-CoV-2 — на 34%. Для обеспечения более эффективной защиты при продолжительном контакте с больным COVID-19 здоровым лицам необходимо использовать респиратор. Лица, чья профессия связана с высоким уровнем социальных контактов, инфицировались реже, чем лица этой же возрастной группы ($p = 0,001$), что подтверждает действенность противоэпидемических мер и приверженность к их соблюдению людьми, чья профессия связана с частыми социальными контактами.

Ключевые слова: ОРВИ, COVID-19, бессимптомное течение, ПЦР, медицинские маски

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (протокол № 106 от 16.06.2020).

Благодарности. Авторы выражают признательность сотрудникам Управлений Роспотребнадзора и ФБУЗ Центров гигиены и эпидемиологии, организовавшим обследование и проведение лабораторных исследований, в особенности: А.А. Мельниковой, И.А. Погарской, М.В. Зубовой, Я.С. Игнашевой, Л.А. Поздняковой, Т.П. Колесенковой, Д.С. Ваниевой, Н.Н. Топилиной, И.В. Шрейдер, О.Н. Гороховой, Е.Л. Протасовой, Т.А. Гавриловой, А.А. Дорожковой, а также всем участникам пилотного проекта Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека «Исследование распространённости возбудителей ОРВИ, гриппа и COVID-19 в межэпидемический период».

Источник финансирования. Исследование проводилось в рамках государственного задания ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

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

Для цитирования: Яцышина С.Б., Мамошина М.В., Елькина М.А., Шарухо Г.В., Распопова Ю.И., Фольмер А.Я., Агапов К.А., Владимиров И.М., Зубарева О.В., Новикова И.С., Бондарева О.Б., Гиль В.А., Козловских Д.Н., Романов С.В., Диконская О.В., Пономарева А.В., Чистякова И.В., Кочнева Н.И., Юровских А.И., Кадникова Е.П., Килячина А.С., Лучинина С.В., Косарева Р.Р., Чиркова Г.Г., Валеуллина Н.Н., Лебедева Л.А., Детковская Т.Н., Аббасова Е.И., Романова О.Б., Пятырова Е.В., Акимкин В.Г. Распространённость возбудителей ОРВИ, гриппа и COVID-19 у лиц без симптомов респираторной инфекции. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2021;98(4):383–396.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-152>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-152>

Prevalence of ARVI, influenza, and COVID-19 pathogens in individuals without symptoms of respiratory infection

Svetlana B. Yatsyshina¹✉, Marina V. Mamoshina¹, Mariya A. Elkina¹, Galina V. Sharukho², Yulia I. Raspopova², Aleksandr Ya. Folmer³, Konstantin A. Agapov⁴, Ivan M. Vladimirov⁴, Olga V. Zubareva⁵, Irina S. Novikova⁵, Olga B. Bondareva⁵, Valeria A. Gil⁵, Dmitry N. Kozlovskikh⁶, Sergey V. Romanov⁷, Olga V. Dikonskaya⁶, Anzhelika V. Ponomareva⁶, Irina V. Chistyakova⁷, Natalia I. Kochneva⁶, Andrey I. Yurovskikh⁷, Ekaterina P. Kadnikova⁶, Anastasia S. Kilyachina⁷, Svetlana V. Luchinina⁸, Raisa R. Kosareva⁸, Galina G. Chirkova⁹, Natalia N. Valeullina⁹, Lyudmila A. Lebedeva¹⁰, Tatyana N. Detkovskaya¹¹, Elena I. Abbasova¹¹, Olga B. Romanova¹², Elena V. Pyatyrova¹², Vasily G. Akimkin¹

¹Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia;

²Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow, Russia;

³Department of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing for Tyumen Region, Tyumen, Russia;

⁴Center of Hygiene and Epidemiology in Saint Petersburg, Saint Petersburg, Russia;

⁵Department of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing for Volgograd region, Volgograd, Russia;

⁶Department of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing for Sverdlovsk Region, Yekaterinburg, Russia;

⁷Center of Hygiene and Epidemiology in the Sverdlovsk Region, Yekaterinburg, Russia;

⁸Department of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing for Chelyabinsk region, Chelyabinsk, Russia;

⁹Center for Hygiene and Epidemiology in the Chelyabinsk region, Russia;

¹⁰Center of Hygiene and Epidemiology in the Khabarovsk Krai, Khabarovsk, Russia;

¹¹Department of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing for Primorsky Krai, Vladivostok, Russia;

¹²Center of Hygiene and Epidemiology in the Primorsky Krai, Vladivostok, Russia

Abstract

Introduction. SARS-CoV-2 can be transmitted by infected people without or with mild symptoms of acute respiratory infection (ARI). Monitoring based on nucleic acid amplification techniques is used to measure the prevalence of ARI pathogens and to assess the effectiveness of preventive measures.

The aim is to measure the prevalence of pathogens causing ARIs of viral etiology, influenza, and COVID-19 among individuals without ARI symptoms throughout age groups, to trace changes in the epidemic situation by

weekly monitoring pathogens during the inter-epidemic period and at the beginning of a typical ARI epidemic season, to assess the effectiveness of medical masks for prevention of the above infections.

Materials and methods. A total of 14,119 people (including 4,582 children) without ARI symptoms went through examination, including questionnaire surveys, in 26 regions of Russia from August to October 2020. Nasopharyngeal and oropharyngeal swabs were tested by using AmpliSens ARVI-screen-FL, AmpliSens Influenza virus A/B-FL, and AmpliSens Cov-Bat-FL reagent kits (The Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor, Moscow).

Results. 11.1% of the tested samples showed positive results; the rhinovirus prevailed (7.32%), while SARS-CoV-2 was detected in 1.66%. In autumn, the proportion of SARS-CoV-2 infected cases increased from 0.49% to 4.02% ($p < 0.001$). The SARS-CoV-2 RNA concentration was up to 10^{10} copies/mL.

Conclusions. Differences in the prevalence of SARS-CoV-2 and rhinovirus among the age groups and over time were found and analyzed. Using of medical masks reduced the risk of infection with respiratory viruses and with SARS-CoV-2 by 51% and 34%, respectively. In case of prolonged exposure to a COVID-19 patient, healthy people must use a respirator for more effective protection. The individuals whose work was associated with a high level of social contacts were infected more rarely than other individuals in the same age group ($p = 0.001$); this fact supports the importance of anti-epidemic measures and commitment to their adherence by people whose profession entails frequent social contacts.

Keywords: ARVI, COVID-19, asymptomatic course, PCR, medical masks

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Central Research Institute of Epidemiology (protocol No. 106, June 16, 2020).

Acknowledgements. The authors express their gratitude to the employees of Rospotrebnadzor directorates and Centers of Hygiene and Epidemiology for the organization of the study and for the conducted laboratory tests, especially to A.A. Melnikova, I.A. Pogarskaya, M.V. Zubova, Ya.S. Ignasheva, L.A. Pozdnyakova, T.P. Kolesenkova, D.S. Vanieva, N.N. Topilina, I.V. Shreider, O.N. Gorokhova, E.L. Protasova, T.A. Gavrilova, A.A. Dorozhkova, and all the participants of the pilot project "The Study of Prevalence of ARVI, Influenza, and COVID-19 Pathogens during the Inter-Epidemic Period", which was initiated by the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rospotrebnadzor).

Funding source. The study was carried out within the framework of the State task of the Central Research Institute of Epidemiology.

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

For citation: Vatsyshina S.B., Mamoshina M.V., Elkina M.A., Sharukho G.V., Raspopova Yu.I., Folmer A.Ya., Agapov K.A., Vladimirov I.M., Zubareva O.V., Novikova I.S., Bondareva O.B., Gil V.A., Kozlovskikh D.N., Romanov S.V., Dikonskaya O.V., Ponomareva A.V., Chistyakova I.V., Kochneva N.I., Yurovskikh A.I., Kadnikova E.P., Kilyachina A.S., Luchinina S.V., Kosareva R.R., Chirkova G.G., Valeullina N.N., Lebedeva L.A., Detkovskaya T.N., Abbasova E.I., Romanova O.B., Pyatyrova E.V., Akimkin V.G. Prevalence of ARVI, influenza, and COVID-19 pathogens in individuals without symptoms of respiratory infection. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(4):383–396.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-152>

Введение

Накопленные за год с момента вспышки COVID-19 в конце декабря 2019 г. в КНР и её перехода в пандемию данные свидетельствуют о том, что в распространении возбудителя могут участвовать инфицированные SARS-CoV-2 лица, у которых отсутствуют или слабо выражены симптомы острой респираторной инфекции (ОРИ). По данным метаанализов [1, 2], доля бессимптомного течения COVID-19 может составлять 40–45%. Однако эти данные в основном были получены для медицинских учреждений и закрытых коллективов, в связи с чем они не отражают распространённость бессимптомной инфекции в популяции.

По мере стремительного распространения SARS-CoV-2 по миру особое значение приобрело обширное тестирование населения с целью прогноза, эффективного проведения и коррекции противоэпидемических мероприятий. Основными методами лабораторной диагностики COVID-19 и выявления её возбудителя являются методы амплификации нуклеиновых кислот.

В связи с вышесказанным особый интерес представляет изучение распространённости возбудителя COVID-19 среди здорового населения и сравнение с другими возбудителями острой респираторной вирусной инфекции (ОРВИ) и гриппа.

SARS-CoV-2 преимущественно передаётся воздушно-капельным путём, также имеет место контактный способ передачи, поскольку образованные при чихании и кашле аэрозоли оседают на объектах и поверхностях, окружающих инфицированного человека [3]. SARS-CoV-2 способен реплицироваться в клетках желудочно-кишечного тракта [4], поэтому возможен фекально-оральный путь передачи вируса.

Одной из мер неспецифической профилактики ОРВИ служит использование средств индивидуальной защиты (СИЗ), в том числе медицинских масок, как инфицированными, так и здоровыми лицами¹.

До настоящего времени в России не проводилось масштабного исследования, позволяющего

¹ МР 3.1.0140-18 «Неспецифическая профилактика гриппа и других острых респираторных инфекций».

оценить эффективность использования в популяции медицинских масок и других СИЗ с целью профилактики ОРВИ, гриппа и COVID-19.

Данное исследование преследовало следующие цели:

- оценить и выявить особенности распространённости возбудителей ОРВИ, гриппа и COVID-19 среди лиц без симптомов ОРВИ в разных возрастных группах, в межэпидемический и в начале традиционного эпидемического сезона ОРВИ с использованием методов амплификации нуклеиновых кислот;
- проследить изменение эпидемической ситуации путём мониторинга в еженедельном режиме распространённости возбудителей ОРВИ, гриппа и COVID-19 среди лиц без симптомов ОРВИ;
- оценить эффективность СИЗ с целью профилактики COVID-19, ОРВИ и гриппа.

Материалы и методы

Работа проводилась в рамках пилотного проекта Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, по исследованию распространённости возбудителей ОРВИ, гриппа и COVID-19 в межэпидемический период и в начале традиционного эпидемического сезона ОРВИ в еженедельной динамике с 01.08.2020 по 16.10.2020 в 26 регионах России.

В исследование включали лиц, не имевших симптомов ОРВИ за последние 2 нед и на момент обследования, подписавших информированное согласие на участие в исследовании. Не включали лиц, пребывавших за границей последние 2 нед, и контингент закрытых коллективов (военнослужащие, контингент учреждений длительного пребывания).

Лабораторное исследование проводили методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Для выявления нуклеиновых кислот 17 видов респираторных вирусов: РНК риновирусов, ДНК аденовирусов, РНК коронавируса человека (229E, OC43, HKU1, NL63), ДНК бокавируса, РНК респираторно-синцитиального вируса, РНК метапневмовируса, РНК вируса парагриппа, РНК вирусов гриппа, РНК коронавируса SARS-CoV-2, использовали наборы реагентов «АмплиСенс ОРВИ-скрин-FL», «АмплиСенс Influenza virus A/B-FL» и «АмплиСенс Cov-Bat-FL» (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора). Биологическим материалом для исследования служили мазки из носоглотки и ротоглотки, собранные согласно методическим рекомендациям МР 3.1.0117-17 «Лабораторная диагностика гриппа и других ОРВИ методом полимеразной цепной реакции», МР 3.1.0169-20 «Лабораторная диагностика COVID-19» при информированном согласии пациентов.

Для статистической обработки и графической визуализации данных использованы «PASW Statistics 18» («SPSS») и «Microsoft Excel 2010».

Результаты

В исследование были включены 14 119 лиц (из них 4582 ребёнка, 9532 взрослых, в 5 случаях сведения о возрасте отсутствовали). Для проведения расчётов формировались группы по возрастным, социальным (школьники и студенты) и профессиональным категориям.

Возрастные группы включали:

- детей до 6 лет ($n = 2116$);
- детей 6–17 лет ($n = 2466$);
- лиц в возрасте 18–25 лет ($n = 2786$);
- лиц в возрасте 26–64 года ($n = 4609$);
- лиц старше 64 лет ($n = 2137$).

За весь период наблюдения искомые возбудители (в совокупности) выявлены у 1572 (11,1%) обследованных. Абсолютное число и доля положительных находок представлены в **табл. 1**. Распространённость SARS-CoV-2, возбудителей ОРВИ и гриппа в возрастных группах представлена в **табл. 2**.

В начале эпидемического сезона искомые возбудители (в совокупности) были обнаружены у 14,7% (689 из 4674) человек, а в межэпидемический период — у 9,35% (883 из 9445) человек ($p < 0,001$).

Максимальное число выявленных случаев инфицирования (7,32%) было обусловлено риновирусом. Доля инфицированных риновирусом лиц была довольно высокой как в межэпидемический, так и в начале эпидемического сезона — 6,61 и 8,75% обследованных соответственно.

SARS-CoV-2 встречался гораздо реже: за весь период наблюдения этот вирус был выявлен у 1,66% обследованных. Тем не менее осенью 2020 г. был зафиксирован статистически значимый рост (в 8,3 раза) доли выявленных случаев инфицирования SARS-CoV-2 (с 0,49 до 4,02%; $p < 0,001$) среди обследованных лиц (табл. 1) в сравнении с этим показателем в августе 2020 г.

Для риновируса доля выявленных случаев инфицирования в начале эпидемического сезона в сравнении с межэпидемическим периодом оказалась выше только в 1,3 раза (табл. 1).

Вирусы парагриппа встречались с одинаковой частотой как в межэпидемический период, так и в начале эпидемического сезона (1,09 и 1,05%). Распространённость остальных возбудителей ОРВИ и вирусов гриппа А и В не превышала 1% (табл. 1).

Отмечены различия в динамике выявления SARS-CoV-2 и риновируса. График понедельной динамики (**рис. 1**) демонстрирует увеличение числа случаев инфицирования риновирусом начиная с 35-й недели и их снижение с 40-й недели. В это время число положительных случаев SARS-CoV-2 равномерно увеличивалось с 35-й по 42-ю неделю

Таблица 1. Число и доля инфицированных SARS-CoV-2, ОРВИ и гриппом среди лиц без симптомов ОРВИ
Table 1. The number and proportion of the SARS-CoV-2, ARVI, and influenza infected among people without ARI symptoms

Возбудитель Pathogen	Весь период наблюдения 31–42-я неделя (n = 14 119) Entire observation period 31–42 week (n = 14,119)		Межэпидемический период (n = 9445) Interepidemic period (n = 9,445)		Начало эпидемического сезона (n = 4674) Beginning of the epidemic season (n = 4,674)		p
	n	%	n	%	n	%	
РНК SARS-CoV-2 SARS-CoV-2 RNA	234	1,66	46	0,49	188	4,02	<0,001
РНК риновирусов Rhinovirus RNA	1033	7,32	624	6,61	409	8,75	<0,001
ДНК аденовируса Adenovirus DNA	36	0,25	25	0,26	11	0,24	0,8
РНК коронавирусов человека (229E, OC43, HKUI, NL63) Human coronaviruses RNA (229E, OC43, HKUI, NL63)	19	0,13	10	0,11	9	0,19	0,2
ДНК бокавируса Bocavirus DNA	18	0,13	15	0,16	3	0,06	0,2
РНК респираторно- синцитиального вируса Human respiratory syncytial virus RNA	21	0,15	17	0,18	4	0,09	0,2
РНК метапневмовируса Metapneumovirus RNA	27	0,19	16	0,17	11	0,24	0,4
РНК вирусов парагриппа Parainfluenza virus RNA	152	1,08	103	1,09	49	1,05	0,9
РНК вируса гриппа А Influenza A RNA	24	0,17	20	0,21	4	0,09	0,1
РНК вируса гриппа В Influenza B RNA	8	0,06	7	0,07	1	0,02	0,3
Всего Total	1572	11,1	883	9,35	689	14,74	<0,001

(прирост за 41-ю и 42-ю недели составил 39 и 21%). Частота распространения других искомым возбудителей не превышала 1% с колебаниями в пределах статистической погрешности.

Полученные нами данные по динамике распространённости риновирусной инфекции и SARS-CoV-2 среди лиц без симптомов ОРВИ согласуются с опубликованными в Еженедельном национальном бюллетене ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России сведениями о частоте диагностирования риновирусной инфекции и COVID-19 у лиц с симптомами ОРВИ². По данным НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, с 39-й недели наблюдается снижение доли положительных случаев риновирусной инфекции и увеличение частоты выявления SARS-CoV-2.

При прогнозировании динамики эпидемического процесса важное значение следует уделять

правильной выборке обследуемых лиц и в первую очередь оценить оптимальный размер выборки, который позволяет выявить статистически значимые различия частоты выявления того или иного возбудителя.

Для расчёта размера выборки обследуемых нами была использована следующая формула [5]:

$$n = \frac{Z^2 pq}{\Delta^2},$$

где:

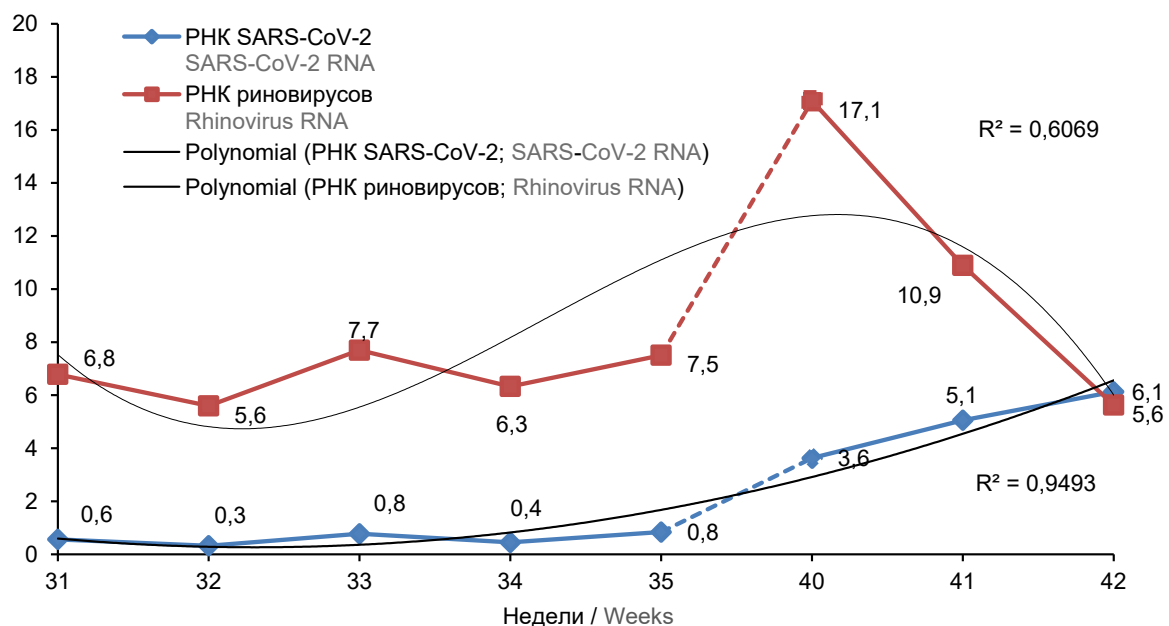
- n — размер выборки для исследования;
- Z — критическое значение критерия Стьюдента при соответствующем уровне значимости (при $\alpha = 0,05$; $Z = 1,96$);
- p — доля случаев, в которых встречается изучаемый признак в популяции;
- q — доля случаев, в которых не встречается изучаемый признак ($100 - p$) в популяции;
- Δ — предельно допустимая ошибка.

В первые недели мониторинга в данном пилотном исследовании были установлены частоты распространённости возбудителей ОРВИ, гриппа и COVID-19, которые были использованы в расчётах

² ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России. Еженедельный национальный бюллетень по гриппу и ОРВИ за 22 неделю 2021 года (31.05.21–06.06.21). Available at: https://www.influenza.spb.ru/system/epidemic_situation/laboratory_diagnostics

Таблица 2. Распространённость SARS-CoV-2, возбудителей ОРВИ и гриппа в возрастных группах**Table 2.** Prevalence of SARS-CoV-2, ARVI, and influenza pathogens in age groups

Возбудитель Pathogen	Возрастная группа, лет Age groups, years												p
	0–2 (n = 532)		3–5 (n = 1584)		6–17 (n = 2466)		18–25 (n = 2786)		26–64 (n = 4609)		>64 (n = 2137)		
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Все возбудители All pathogens	80	15,04	299	18,88	341	13,83	262	9,40	389	8,44	154	7,21	<0,001
PHK SARS-CoV-2 SARS-CoV-2 RNA	5	0,94	15	0,95	41	1,66	35	1,26	94	2,04	44	2,06	<0,01
PHK риновирусов Rhinovirus RNA	61	11,47	248	15,66	258	10,46	170	6,10	222	4,82	74	3,46	<0,001
ДНК аденовируса Adenovirus DNA	9	1,69	9	0,57	2	0,08	4	0,14	9	0,20	3	0,14	<0,001
PHK коронавируса человека (229E, OC43, HKU1, NL63) Human coronaviruses RNA (229E, OC43, HKU1, NL63)	2	0,38	2	0,13	3	0,12	7	0,25	4	0,09	1	0,05	0,2
ДНК бокавируса Bocavirus DNA	1	0,19	2	0,13	5	0,20	4	0,14	4	0,09	2	0,09	0,8
PHK респираторно- синцитиального вируса Human respiratory syncytial virus RNA	1	0,19	4	0,25	3	0,12	2	0,07	6	0,13	5	0,23	0,6
PHK метапневмовируса Metapneumovirus RNA	2	0,38	7	0,44	2	0,08	5	0,18	8	0,17	3	0,14	0,2
PHK вирусов парагриппа Parainfluenza virus RNA	5	0,94	18	1,14	32	1,30	30	1,08	43	0,93	24	1,12	0,8
PHK вируса гриппа А Influenza A RNA	1	0,19	2	0,13	4	0,16	6	0,22	7	0,15	4	0,19	1
PHK вируса гриппа В Influenza B RNA	1	0,19	1	0,06	0	0,00	4	0,14	1	0,02	1	0,05	0,2

**Рис. 1.** Понедельная динамика изменения числа инфицированных.

По оси ординат — доля положительных случаев от числа обследованных, %.

Fig. 1. Weekly dynamics of the number of the infected.

The vertical axis shows the proportion of positive cases in the total number of participants, %.

размера выборки. Минимальный размер выборки для возбудителей, распространённость которых выше 1%, составил не менее 1961 человека. Такой размер выборки обеспечивает выявление статистически значимых различий показателей при проведении мониторинга в понедельной динамике. Таких размеров выборки и придерживались до конца исследования.

Особый интерес представляли вопросы, какие возрастные группы вовлечены в эпидемический процесс ОРВИ и имеются ли какие-либо особенности в случае COVID-19. Иными словами, важно было оценить динамику выявления разных возбудителей ОРВИ, гриппа и COVID-19 у лиц разного возраста.

За весь период наблюдения максимальная доля выявления искомых возбудителей в совокупности была зарегистрирована в возрастной группе 3–5 лет (18,9%). В подавляющем большинстве случаев выявлялся риновирус, обнаруженный в возрастной группе 3–5 лет у 15,66% обследованных, далее в порядке убывания следовали группа до 2 лет (11,5%) и 6–17 лет (10,5%), у взрослых риновирус обнаруживался статистически значимо реже ($p < 0,001$; табл. 2).

SARS-CoV-2, напротив, чаще обнаруживался у взрослых старше 26 лет и реже у детей младшего возраста (2,0% vs 0,95%) ($p < 0,01$). В группах 6–17 и 18–25 лет SARS-CoV-2 выявлен у 1,66 и 1,26% обследованных соответственно.

Доля инфицированных аденовирусом детей в возрасте до 2 лет оказалась статистически значимо больше, чем детей старшего возраста (6–17 лет): 1,69 и 0,08% ($p < 0,05$; табл. 2).

Наблюдались также различия в динамике выявления SARS-CoV-2 и риновируса в разных возрастных группах (рис. 2, 3).

На 40-й неделе наблюдался рост инфицированности SARS-CoV-2 детей школьного возраста

(6–17 лет), взрослых 18–25 лет и лиц старше 64 лет. Неделями позже произошло увеличение доли инфицированных взрослых 26–64 лет, которая достигла к 42-й неделе максимальных значений, превышающих в 2 и 3 раза долю инфицированных SARS-CoV-2 детей 6–17 лет и лиц 18–25 лет соответственно. В группе детей дошкольного возраста (0–5 лет) значимого роста частоты инфицированности SARS-CoV-2 осенью не отмечено (рис. 2).

Для риновируса, напротив, у лиц в возрасте 26–64 и старше, в сравнении с другими возрастными группами, отмечался минимальный уровень инфицированности на протяжении всего периода наблюдения. В то же время у детей и лиц в возрасте 18–25 лет зафиксирован значительный рост частоты выявления риновируса к 40-й неделе и спад до начального уровня к 42-й неделе (рис. 3).

Обсуждение

Таким образом, в результате исследования установлено, что осенью 2020 г. в эпидемический процесс распространения SARS-CoV-2 первоначально были вовлечены школьники (6–17 лет), молодые взрослые (18–25 лет) и пожилые люди (>64 лет), следом за ними вырос уровень инфицирования взрослых (26–64 года). Дошкольники были вовлечены в эпидемический процесс распространения SARS-CoV-2 в меньшей степени.

Отдельно оценивалась распространённость возбудителей среди студентов. В период начала эпидемического сезона студенты инфицировались искомыми возбудителями в совокупности реже, чем дети в целом (11,5 и 19,7%; $p < 0,001$) и школьники (11,5 и 18,9%; $p < 0,001$). Риновирусная инфекция встречалась у студентов также реже, чем у детей и школьников (7,3, 15,5 и 13,2%; $p < 0,001$). В то же

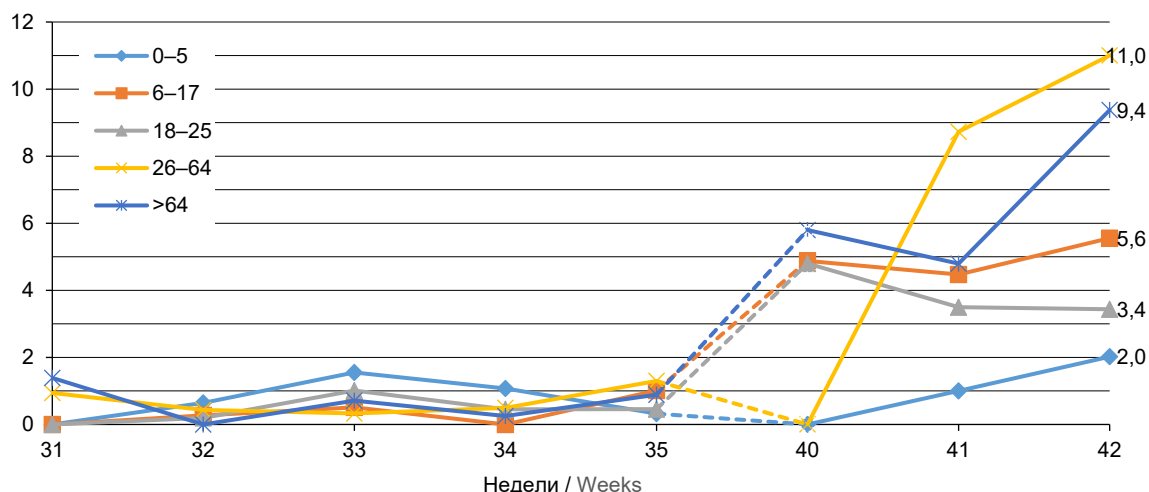


Рис. 2. Динамика частоты выявления SARS-CoV-2 в возрастных группах.

По оси ординат — доля положительных случаев от числа обследованных, %.

Fig. 2. Dynamics of the SARS-CoV-2 detection rates in age groups.

The vertical axis shows the proportion of positive cases in the total number of participants, %

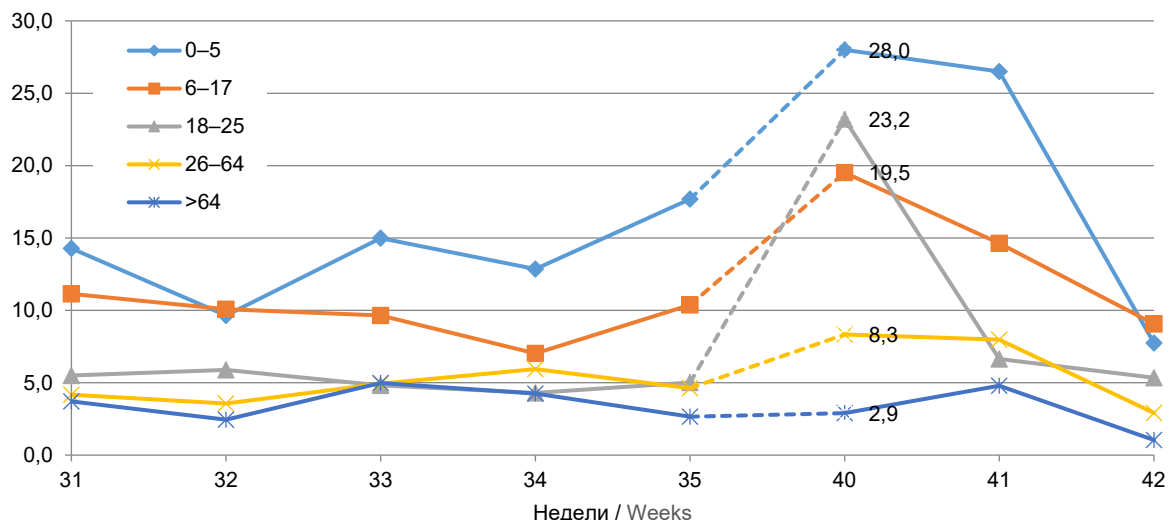


Рис. 3. Динамика частоты выявления риновируса в возрастных группах.

По оси ординат — доля положительных случаев от числа обследованных, %.

Fig. 3. Dynamics of rhinovirus detection rates in age groups.

The vertical axis shows the proportion of positive cases in the total number of participants, %.

время SARS-CoV-2 встречался во всех 3 группах практически с одинаковой частотой: 2,3, 2,4 и 3,7%. Таким образом, полученные данные не могут охарактеризовать студентов как группу особого риска по ОРВИ, включая COVID-19.

Установлено, что наибольший вклад в распространение ОРВИ привносят дошкольники, в то время как в распространение SARS-CoV-2 они вовлечены в меньшей степени в сравнении с другими группами населения.

С целью оценки эффективности СИЗ проводилось анкетирование обследуемых по вопросам:

- «Используете ли Вы СИЗ?»;
- «Какие СИЗ Вы используете (выбор из перечня)?»;
- «Был ли у Вас тесный контакт с больным ОРВИ за последние 2 недели?».

Наличие тесного контакта с больными ОРВИ за последние 2 нед отметили 443 человека. Перечень использованных СИЗ и количество лиц, использовавших те или иные варианты СИЗ, представлены в **табл. 3**.

При анализе эффективности СИЗ (медицинская маска, перчатки, обработка рук дезинфицирующими средствами, респиратор, защитный экран и их комбинации) установлено, что среди лиц, использовавших СИЗ, количество инфицированных искомыми возбудителями (ОРВИ, гриппа и COVID-19) в совокупности было статистически значимо меньше, чем среди тех, кто СИЗ не использовал (9,6% vs 18,0%; $p < 0,001$) (**табл. 4**). Использование СИЗ снижало на 52% риск инфицирования искомыми возбудителями в совокупности: отношение шансов (ОШ) = 0,48; 95% доверительный интервал (ДИ) 0,43–0,55.

Установлено, что использование СИЗ снижает риск инфицирования SARS-CoV-2 на 53% ($p < 0,001$; ОШ = 0,47; 95% ДИ 0,35–0,63), а риновирусом — на 50% (ОШ = 0,5; 95% ДИ 0,43–0,58) (**табл. 4**).

Использование медицинской маски снижало в 1,9 раза вероятность заражения искомыми возбудителями в совокупности, риск инфицирования при использовании медицинской маски снижался на 51% (18,0% vs 9,6%; $p < 0,001$; ОШ = 0,49; 95% ДИ 0,41–0,57). При использовании только медицинской маски вероятность заражения SARS-CoV-2 снижалась на 34% (ОШ = 0,66; 95% ДИ 0,47–0,93), а риновирусной инфекцией — на 51% (ОШ = 0,49; 95% ДИ 0,41–0,59). Использование медицинской маски в комбинации с другими СИЗ снижало риск заражения искомыми возбудителями на 54% (18,0% vs 9,2%; $p < 0,001$; ОШ = 0,46; 95% ДИ 0,41–0,53). Среди различных комбинаций использования СИЗ наиболее часто встречались сочетания медицинской маски и перчаток. Использование перчаток в комбинации с медицинской маской демонстрирует преимущество в сравнении с медицинской маской (7,1% vs. 9,6% инфицированных; $p = 0,007$). Для остальных СИЗ или их комбинаций статистически значимой разницы в группах не выявлено, что можно объяснить небольшой численностью сравниваемых выборок.

Полученные данные согласуются с результатами метаанализа [6]. М. Liang и соавт. установили, что использование медицинской маски обеспечивало значительный защитный эффект против возбудителей ОРВИ: риск инфицирования снижался на 65% (ОШ = 0,35; 95% ДИ 0,24–0,51).

Защитные свойства медицинской маски при профилактике COVID-19 были продемонстрирова-

Таблица 3. Комбинации СИЗ, встречавшиеся среди обследованных лиц
Table 3. PPE combinations used by the study participants

Варианты комбинаций СИЗ Combinations of PPE	Выборка в целом (n = 12 059) Full sample (n = 12,059)	
	n	%
Медицинская маска / Medical mask	3650	30,27
Перчатки / Gloves	8	0,07
Респиратор / Respirator	7	0,06
Средства дезинфекции рук / Hand sanitizers	295	2,45
Медицинская маска, средства дезинфекции рук / Medical mask, hand sanitizers	3302	27,38
Медицинская маска, перчатки, средства дезинфекции рук Medical mask, gloves, hand sanitizers	2854	23,67
Медицинская маска, перчатки / Medical mask, gloves	1485	12,31
Медицинская маска, защитный экран, перчатки, средства дезинфекции рук Medical mask, face shield, gloves, hand sanitizers	145	1,20
Медицинская маска, респиратор, перчатки, средства дезинфекции рук Medical mask, respirator, gloves, hand sanitizers	38	0,32
Медицинская маска, защитный экран, средства дезинфекции рук Medical mask, face shield, hand sanitizer	22	0,18
Респиратор, средства дезинфекции рук / Respirator, hand sanitizers	8	0,07
Медицинская маска, респиратор, защитный экран, перчатки, средства дезинфекции рук Medical mask, respirator, face shield, gloves, hand sanitizers	102	0,85
Респиратор, перчатки / Respirator, gloves	12	0,10
Защитный экран, перчатки, средства дезинфекции рук / Face shield, gloves, hand sanitizers	1	0,01
Респиратор, защитный экран, перчатки / Respirator, face shield, gloves	1	0,01
Медицинская маска, защитный экран, перчатки / Medical mask, face shield, gloves	37	0,31
Медицинская маска, респиратор, перчатки / Medical mask, respirator, gloves	8	0,07
Медицинская маска, респиратор, защитный экран, перчатки Medical mask, respirator, face shield, gloves	2	0,02
Медицинская маска, респиратор, средства дезинфекции рук Medical mask, respirator, hand sanitizers	13	0,11
Медицинская маска, респиратор / Medical mask, respirator	15	0,12
Респиратор, перчатки, средства дезинфекции рук / Respirator, gloves, hand sanitizers	41	0,34
Защитный экран, средства дезинфекции рук / Face shield, hand sanitizers	1	0,01
Респиратор, защитный экран, перчатки, средства дезинфекции рук Respirator, face shield, gloves, hand sanitizers	5	0,04
Перчатки, средства дезинфекции рук / Gloves, hand sanitizers	7	0,06

ны экспериментально. Н. Ueki и соавт. смоделировали процесс передачи вируса SARS-CoV-2 воздушно-капельным путём: в герметично закрытом боксе расположили двух манекенов напротив друг друга на расстоянии 50 см. Один из манекенов служил моделью источника вируса SARS-CoV-2 (распылял аэрозоль, содержащий коронавирус SARS-CoV-2), второй — моделью реципиента. Наличие и количество вируса внутри манекена-реципиента определялось методом ПЦР и выделением вируса в культуре клеток [7]. В случае, когда медицинская маска была надета на манекен-реципиент, количество вирусных частиц сокращалось на 50% в сравнении с ситуацией, когда медицинская маска на реципиенте отсутствовала. При расположении медицинской маски на

лице манекена, распылявшего аэрозоль, количество вирусных частиц внутри реципиента сокращалось на 60%. Эксперимент проводился в условиях максимально плотного прилегания медицинской маски к «лицу» манекена.

В нашем исследовании среди лиц, отмечавших тесный контакт с больными ОРИ за последние 2 нед, у 24% был выявлен один из искомым возбудителей, при этом статистически значимых различий по уровню инфицирования между использовавшими и не использовавшими СИЗ не обнаружено ($p = 0,06$). Эти данные свидетельствуют о том, что в очаге инфекции, помимо СИЗ, необходимо применять полный объём противоэпидемических мероприятий, и в первую очередь требуется изоляция инфи-

Таблица 4. Эффективность использования СИЗ
Table 4. Effectiveness of using PPE

Варианты комбинаций СИЗ Combinations of PPE	Инфицирован любым из искомым возбудителей Infected with any of the pathogens				Инфицирован SARS-CoV-2 Infected with SARS-CoV-2				Инфицирован риновирусом Infected with Rhinovirus						
	инфицирован infected		не инфицирован not infected		инфицирован infected		не инфицирован not infected		инфицирован infected		не инфицирован not infected		p , ОШ p , OR		
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	p , ОШ p , OR	p , ОШ p , OR	
Все СИЗ All PPEs	использует used	1155	9,6	10904	90,4	172	1,4	11887	98,6	781	6,5	11278	93,5	$p < 0,001$ OR = 0,47 95% CI 0,35–0,63	$p < 0,001$ OR = 0,5 95% CI 0,43–0,58
	не использует not used	370	18,0	1690	82,0	62	3,0	1998	97,0	252	12,2	1808	87,8		
Медицинская маска Medical mask	использует used	351	9,6	3299	90,4	73	2,0	3577	98,0	234	6,4	3416	93,6	$p < 0,001$ OR = 0,66 95% CI 0,47–0,93	$p < 0,001$ OR = 0,49 95% CI 0,41–0,59
	не использует not used	370	18,0	1690	82,0	62	3,0	1998	97,0	252	12,2	1808	87,8		
Медицинская маска и другие СИЗ Medical mask combined with other PPEs	использует used	1077	9,2	10596	90,8	166	1,4	11507	98,6	724	6,2	1808	87,8	$p < 0,001$ OR = 0,47 95% CI 0,35–0,63	$p < 0,001$ OR = 0,47 95% CI 0,41–0,55
	не использует not used	370	18,0	1690	82,0	62	3,0	1998	97,0	252	12,2	10949	92,8		

цированного³. При невозможности изоляции больного для обеспечения более эффективной защиты при длительном контакте необходимо использовать респиратор, который носит здоровый.

Отдельное внимание в нашем исследовании уделялось вопросу профилактики ОРВИ, в частности, COVID-19, у лиц, сфера профессиональной деятельности которых сопряжена с высоким уровнем социальных контактов. В такую группу вошли 2552 человека: кассиры/продавцы сетевых продовольственных магазинов, работники общественного транспорта (водители такси, кондукторы, проводники), сотрудники служб досмотра пассажиров в аэропортах. Установлено, что за период начала эпидемического сезона лица, чья профессия связана с высоким уровнем социальных контактов, инфицировались реже, чем представители этой же возрастной группы: SARS-CoV-2 был выявлен у 3,4 и 6,8% ($p = 0,001$), риновирус — у 4,0 и 5,7% ($p = 0,09$), все возбудители в совокупности — у 9,0 и 13,8% соответственно ($p = 0,001$). Вероятнее всего, более низкий уровень инфицирования связан с более строгим соблюдением противоэпидемических мер сотрудниками, чья профессиональная деятельность связана с более высоким риском инфицирования.

Особый интерес представляли сведения относительно нагрузки вирусной РНК у лиц, инфицированных COVID-19, но не имевших симптомов ОРВИ.

По нашим данным, ориентируясь на значения и разброс пороговых циклов амплификации (рис. 4), нагрузка РНК у обследованных в данном исследовании лиц варьировала в широком диапазоне: от предела детекции до $\sim 10^{10}$ копий РНК в 1 мл образца.

Таким образом, лица с бессимптомно протекающей COVID-19, имеющие высокую концентрацию SARS-CoV-2, могут служить опасным источником инфекции, особенно когда не носят медицинские маски, поскольку для передачи возбудителя воздушно-капельным путём будет достаточно даже кратковременного контакта с ними.

Заключение

Данное исследование позволило оценить распространённость возбудителей ОРВИ, гриппа и COVID-19 среди лиц без симптомов ОРВИ, а также эффективность использования в популяции медицинских масок с целью профилактики данных инфекций.

За весь период наблюдения искомые возбудители выявлены у 11,1% обследованных с превалированием риновируса, РНК SARS-CoV-2 обнаружена у 1,66% обследованных, доля остальных вирусов не превышала 1%. Следует иметь в виду, что среди

³ МР 3.1.0140-18 «Неспецифическая профилактика гриппа и других острых респираторных инфекций»

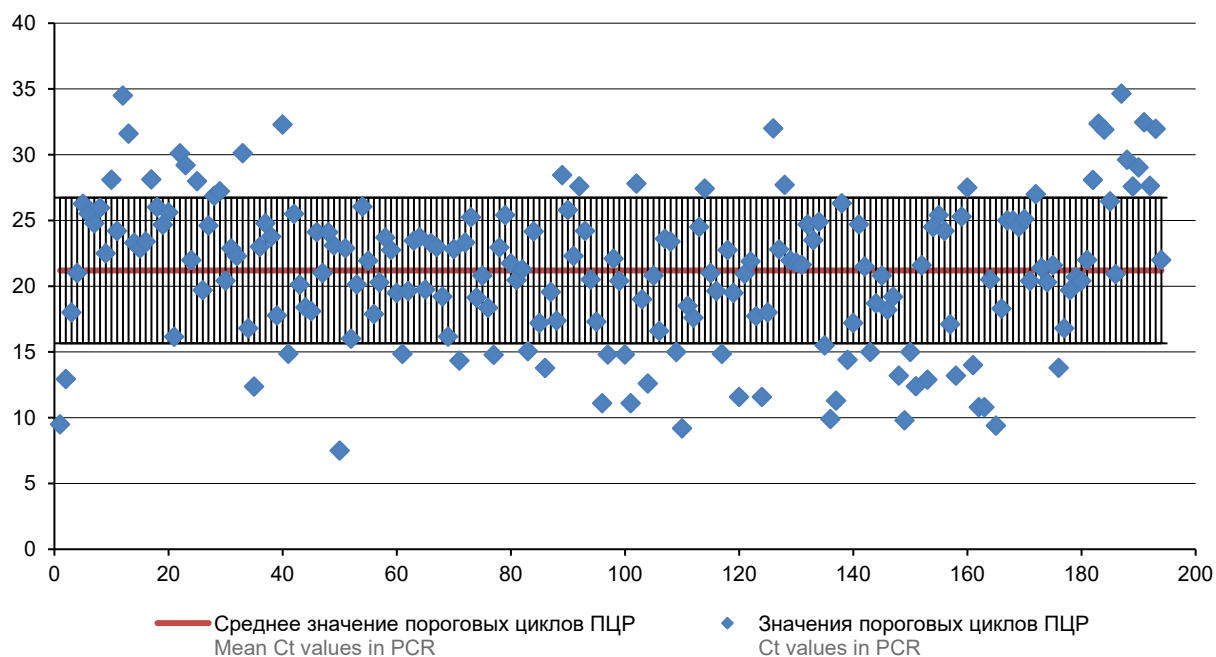


Рис. 4. Значения пороговых циклов ПЦР с флюоресцентной детекцией в реальном времени у инфицированных SARS-CoV-2 без симптомов ОРВИ.

По оси абсцисс — номер образца, положительного на COVID-19; по оси ординат — значения пороговых циклов ПЦР.

Fig. 4. Threshold cycle values in real-time PCR with fluorescent detection in SARS-CoV-2 infected individuals without ARI symptoms.

The horizontal axis shows the number of the sample positive for COVID-19; the vertical axis shows PCR threshold cycle values.

выявленных инфицированных могли быть «пре-симптомные» лица, т.е. те, у кого симптомы ОРВИ могли бы проявиться впоследствии, поскольку дизайн исследования не предполагал последующего наблюдения за инфицированными.

Установлены различия изменений частот SARS-CoV-2 и ОРВИ в динамике и в различных возрастных группах: в распространении возбудителя COVID-19 в начале эпидемического сезона участвовали дети школьного возраста, молодые взрослые и лица старше 64 лет с последующим вовлечением взрослых 26–64 лет. Дошкольники участвовали в эпидемическом процессе распространения SARS-CoV-2 в меньшей степени. Наибольший вклад в распространение ОРВИ привносят дошкольники, среди лиц старше 26 лет уровень инфицированности риновирусом на протяжении всего периода наблюдения был минимален. SARS-CoV-2, напротив, чаще обнаруживался у взрослых старше 26 лет.

Наше исследование продемонстрировало, что лица без симптомов ОРВИ могут иметь высокую концентрацию РНК SARS-CoV-2 (до 10^{10} копий РНК в 1 мл образца мазка из носо- и ротоглотки), поэтому могут служить опасным источником инфекции, особенно когда не носят медицинские маски, поскольку для передачи возбудителя воздушно-капельным путём будет достаточно даже кратковременного контакта с ними.

Установлено, что среди лиц, использовавших СИЗ, количество инфицированных искомыми возбудителями в совокупности было статистически значимо меньше, чем среди тех, кто СИЗ не использовал (9,6% vs 18,0%; $p < 0,001$), применение медицинской маски снижало риск инфицирования на 51% (ОШ = 0,49; 95% ДИ 0,41–0,57). Комбинация медицинской маски с другими СИЗ снижала риск заражения искомыми возбудителями на 54% (ОШ = 0,46; 95% ДИ 0,41–0,53).

В случае SARS-CoV-2 применение СИЗ снижало риск инфицирования на 53% (ОШ = 0,47; 95% ДИ 0,35–0,63), для лиц, использовавших медицинскую маску, вероятность заражения SARS-CoV-2 снижалась на 34% (ОШ = 0,66; 95% ДИ 0,47–0,93).

Таким образом ношение медицинских масок в общественных местах является необходимой и действенной противоэпидемической мерой, поскольку ношение маски инфицированными, включая лиц, не имеющих симптомов ОРВИ, сокращает распространение вируса, а маска на здоровых снижает вероятность их заражения.

Для обеспечения более эффективной защиты при продолжительном контакте с больным, например в очаге COVID-19, здоровым лицам необходимо использовать респиратор.

Установлено, что лица, чья профессия связана с высоким уровнем социальных контактов, инфицировались реже, чем другие представители этой

же возрастной группы: SARS-CoV-2 в начале эпидемического сезона был выявлен у 3,4 и 6,8% обследованных соответственно ($p = 0,001$), что подтверждает действенность противоэпидемических мер и показывает приверженность к их соблюдению людьми, чья профессиональная деятельность связана с более высоким риском инфицирования.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Oran D.P., Topol E.J. Prevalence of asymptomatic SARS-CoV-2 infection: A narrative review. *Ann. Intern. Med.* 2020; 173(5): 362–7. <https://doi.org/10.1093/almcal/agu083>
2. He W., Yi G.Y., Zhu Y. Estimation of the basic reproduction number, average incubation time, asymptomatic infection rate, and case fatality rate for COVID-19: Meta-analysis and sensitivity analysis. *J. Med. Virol.* 2020; 92(11): 2543–50. <https://doi.org/10.1002/jmv.26041>
3. Kumar M., Taki K., Gahlot R., Sharma A., Dhangar K. A chronicle of SARS-CoV-2: Part-I — epidemiology, diagnosis, prognosis, transmission and treatment. *Sci. Total Environ.* 2020; 734: 139278. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139278>
4. Xiao F., Tang M., Zheng X., Liu Y., Li X., Shan H. Evidence for gastrointestinal infection of SARS-CoV-2. *Gastroenterology.* 2020; 158(6): 1831–3.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.02.055>
5. Койчубеков Б.К., Сорокина М.А., Мхитарян К.Э. Определение размера выборки при планировании научного исследования. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* 2014; (4): 71–4.
6. Liang M., Gao L., Cheng C., Zhou Q., Uy J.P., Heiner K., et al. Efficacy of face mask in preventing respiratory virus transmission: A systematic review and meta-analysis. *Travel Med. Infect. Dis.* 2020; 36: 101751. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2020.101751>

Информация об авторах

Яцышина Светлана Борисовна[✉] — к.б.н., рук. Научной группы по разработке новых методов диагностики ОРЗ ЦНИИ эпидемиологии, Москва, Россия, svetlana.yatsyshina@pcr.ms, <https://orcid.org/0000-0003-4737-941X>

Мамошина Марина Васильевна — м.н.с. Научной группы по разработке новых методов диагностики ОРЗ ЦНИИ эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1419-7807>

Елькина Мария Александровна — м.н.с. Научной группы по разработке новых методов диагностики ОРЗ ЦНИИ эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4769-6781>

Шарухо Галина Васильевна — д.м.н., рук. Управления Роспотребнадзора по Тюменской области, Тюмень, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0772-8224>

Распопова Юлия Ивановна — зам. рук. Управления Роспотребнадзора по Тюменской области, Тюмень, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5754-6755>

Фольмер Александр Яковлевич — к.м.н., главный врач Центра гигиены и эпидемиологии в Тюменской области, Тюмень, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8323-6470>

Агапов Константин Анатольевич — зав. лаб. особо опасных и вирусологических исследований Центра гигиены и эпидемиологии в г. Санкт-Петербург, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8185-3624>

Владимиров Иван Михайлович — врач-эпидемиолог Центра гигиены и эпидемиологии в г. Санкт-Петербург, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7030-1552>

7. Ueki H., Furusawa Y., Iwatsuki-Horimoto K., Imai M., Kabata H., Nishimura H., et al. Effectiveness of face masks in preventing airborne transmission of SARS-CoV-2. *mSphere.* 2020; 5(5): e00637-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00637-20>

REFERENCES

1. Oran D.P., Topol E.J. Prevalence of asymptomatic SARS-CoV-2 infection: A narrative review. *Ann. Intern. Med.* 2020; 173(5): 362–7. <https://doi.org/10.1093/almcal/agu083>
2. He W., Yi G.Y., Zhu Y. Estimation of the basic reproduction number, average incubation time, asymptomatic infection rate, and case fatality rate for COVID-19: Meta-analysis and sensitivity analysis. *J. Med. Virol.* 2020; 92(11): 2543–50. <https://doi.org/10.1002/jmv.26041>
3. Kumar M., Taki K., Gahlot R., Sharma A., Dhangar K. A chronicle of SARS-CoV-2: Part-I — epidemiology, diagnosis, prognosis, transmission and treatment. *Sci. Total Environ.* 2020; 734: 139278. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139278>
4. Xiao F., Tang M., Zheng X., Liu Y., Li X., Shan H. Evidence for gastrointestinal infection of SARS-CoV-2. *Gastroenterology.* 2020; 158(6): 1831–3.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.02.055>
5. Koychubekov B.K., Sorokina M.A., Mkhitarян K.E. Sample size determination in planning of scientific research. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy.* 2014; (4): 71–4. (in Russian)
6. Liang M., Gao L., Cheng C., Zhou Q., Uy J.P., Heiner K., et al. Efficacy of face mask in preventing respiratory virus transmission: A systematic review and meta-analysis. *Travel Med. Infect. Dis.* 2020; 36: 101751. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2020.101751>
7. Ueki H., Furusawa Y., Iwatsuki-Horimoto K., Imai M., Kabata H., Nishimura H., et al. Effectiveness of face masks in preventing airborne transmission of SARS-CoV-2. *mSphere.* 2020; 5(5): e00637-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00637-20>

Information about the authors

Svetlana B. Yatsyshina[✉] — Cand. Sci. (Biol.), Head, Scientific group on the development of new diagnostic methods of ARI diagnostics, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, svetlana.yatsyshina@pcr.ms, <https://orcid.org/0000-0003-4737-941X>

Marina V. Mamoshina — junior researcher, Scientific group on the development of new diagnostic methods of ARI diagnostics, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1419-7807>

Mariya A. Elkina — junior researcher, Scientific group on the development of new diagnostic methods of ARI diagnostics, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4769-6781>

Galina V. Sharukho — D. Sci (Med.), Head, Department of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing for Tyumen Region, Tyumen, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0772-8224>

Yulia I. Raspopova — Deputy head, Department of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing in the Tyumen Region, Tyumen, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5754-6755>

Aleksandr Ya. Folmer — Cand. Sci. (Med.), Chief physician, Center for Hygiene and Epidemiology in the Tyumen Region, Tyumen, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8323-6470>

Konstantin A. Agapov — Head, Laboratory of particularly dangerous and virological studies, Center of Hygiene and Epidemiology in Saint Petersburg, Saint Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8185-3624>

Ivan M. Vladimirov — epidemiologist, Center of Hygiene and Epidemiology in Saint Petersburg, Saint Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7030-1552>

Зубарева Ольга Владимировна — рук. Управления Роспотребнадзора по Волгоградской области, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6863-0701>

Новикова Ирина Сергеевна — главный специалист-эксперт отдела эпидемиологического надзора Управления Роспотребнадзора по Волгоградской области, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0718-0641>

Бондарева Ольга Борисовна — начальник отдела эпидемиологического надзора Управления Роспотребнадзора по Волгоградской области, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7711-7608>

Гиль Валерия Александровна — специалист-эксперт отдела эпидемиологического надзора Управления Роспотребнадзора по Волгоградской области, <https://orcid.org/0000-0002-5691-0471>

Козловских Дмитрий Николаевич — рук. Управления Роспотребнадзора по Свердловской области, <https://orcid.org/0000-0003-0360-7695>

Романов Сергей Викторович — главный врач Центра гигиены и эпидемиологии в Свердловской области, Екатеринбург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7357-9496>

Диконская Ольга Викторовна — зам. рук. Управления Роспотребнадзора по Свердловской области, Екатеринбург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2249-4748>

Пономарева Анжелика Владимировна — зам. рук. Управления Роспотребнадзора по Свердловской области, Екатеринбург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5236-3458>

Чистякова Ирина Викторовна — зам. главного врача Центра гигиены и эпидемиологии в Свердловской области, Екатеринбург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3247-9269>

Кочнева Наталья Ивановна — главный специалист-эксперт отдела социально-гигиенического мониторинга Управления Роспотребнадзора по Свердловской области, Екатеринбург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7316-854X>

Юровских Андрей Иванович — зам. главного врача Центра гигиены и эпидемиологии в Свердловской области, Екатеринбург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1555-7931>

Кадникова Екатерина Петровна — нач. отдела социально-гигиенического мониторинга Управления Роспотребнадзора по Свердловской области, Екатеринбург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8891-1922>

Клячина Анастасия Сергеевна — зав. лаб. контроля биологических факторов Центра гигиены и эпидемиологии в Свердловской области, Екатеринбург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1751-3462>

Лучинина Светлана Васильевна — д.м.н., зам. рук. Управления Роспотребнадзора по Челябинской области, Челябинск, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5705-8850>

Косарева Раиса Рафаэльевна — начальник отдела эпидемиологического надзора Управления Роспотребнадзора по Челябинской области, Челябинск, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5332-4218>

Чиркова Галина Григорьевна — зав. вирусологической лабораторией Центра гигиены и эпидемиологии в Челябинской области, Челябинск, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7220-0456>

Валеуллина Наталья Николаевна — главный врач Центра гигиены и эпидемиологии в Челябинской области, Челябинск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0677-4571>

Лебедева Людмила Андреевна — зав. вирусологической лабораторией Центра гигиены и эпидемиологии в Хабаровском крае, Хабаровск, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2792-0424>

Детковская Татьяна Николаевна — рук. Управления Роспотребнадзора по Приморскому краю, Владивосток, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7543-0633>

Аббасова Елена Ивановна — начальник отдела эпидемиологического надзора Управления Роспотребнадзора по Приморскому краю, Владивосток, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3278-9216>

Olga V. Zubareva — Head, Department of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing in the Volgograd Region, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6863-0701>

Irina S. Novikova — main specialist-expert of Epidemiological surveillance department, Department of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing in the Volgograd Region, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0718-0641>

Olga B. Bondareva — Head, Epidemiological surveillance department, Department of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing for Volgograd region, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7711-7608>

Valeria A. Gil — specialist-expert of epidemiological surveillance department, Department of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing for Volgograd region, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5691-0471>

Dmitry N. Kozlovskikh — Head, Department of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing for Sverdlovsk Region, Yekaterinburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0360-7695>

Sergey V. Romanov — Deputy chief physician, Center of Hygiene and Epidemiology in the Sverdlovsk Region, Yekaterinburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7357-9496>

Olga V. Dikonskaya — Deputy Head, Department of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing for Sverdlovsk Region, Yekaterinburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2249-4748>

Anzhelika V. Ponomareva — Deputy Head, Department of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing for Sverdlovsk Region, Yekaterinburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5236-3458>

Irina V. Chistyakova — Deputy chief physician, Center of Hygiene and Epidemiology in the Sverdlovsk Region, Yekaterinburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3247-9269>

Natalia I. Kochneva — Chief specialist-expert of social and hygienic monitoring department, Department of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing for Sverdlovsk Region, Yekaterinburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7316-854X>

Andrey I. Yurovskikh — Deputy chief physician, Center of Hygiene and Epidemiology in the Sverdlovsk Region, Yekaterinburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1555-7931>

Ekaterina P. Kadnikova — Head, Social and hygienic monitoring department of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing for Sverdlovsk Region, Yekaterinburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8891-1922>

Anastasia S. Kilyachina — Head, Laboratory of biological factors control, Center of Hygiene and Epidemiology in the Sverdlovsk Region, Yekaterinburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1751-3462>

Svetlana V. Luchinina — D. Sci. (Med.), Deputy Head, Department of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing for Chelyabinsk region, Chelyabinsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5705-8850>

Raisa R. Kosareva — Head, Epidemiological surveillance department, Department of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing for Chelyabinsk region, Chelyabinsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5332-4218>

Galina G. Chirkova — Head, Virological laboratory, Center for Hygiene and Epidemiology in the Chelyabinsk region, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7220-0456>

Natalia N. Valeullina — Chief physician, Center for Hygiene and Epidemiology in the Chelyabinsk region, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0677-4571>

Lyudmila A. Lebedeva — Head, Virological laboratory, Center for Hygiene and Epidemiology in the Khabarovsk Territory, Khabarovsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2792-0424>

Tatyana N. Detkovskaya — Head, Department of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing for Primorsky Kray, Vladivostok, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7543-0633>

Elena I. Abbasova — Head, Epidemiological surveillance department, Department of Federal Service for Surveillance on Consumer

Романова Ольга Борисовна — главный врач Центра гигиены и эпидемиологии в Приморском крае, Владивосток, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2290-8610>

Пятырова Елена Владимировна — зам. главного врача по организации экспертной деятельности Центра гигиены и эпидемиологии в Приморском крае, Владивосток, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6750-8920>

Акимкин Василий Геннадьевич — д.м.н., академик РАН, директор ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>

Участие авторов. Все соавторы принимали непосредственное участие в организации обследования и анкетирования участников, а также в проведении лабораторных исследований и анализе результатов межрегионального научно-исследовательского проекта, проводимого в 26 регионах РФ, внесли существенный вклад в подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 06.04.2021;
принята к публикации 21.06.2021;
опубликована 20.07.2021

Rights Protection and Human Wellbeing for Primorsky Kray, Vladivostok, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3278-9216>

Olga B. Romanova — Chief physician, Center of Hygiene and Epidemiology in the Primorsky Kray, Vladivostok, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2290-8610>

Elena V. Pyatyrova — Deputy chief physician for the organization of expert activities, Center of Hygiene and Epidemiology in the Primorsky Kray, Vladivostok, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6750-8920>

Vasily G. Akimkin — D. Sci. (Med.), Professor, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Director, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>

Author contribution. All authors were directly involved in the organization of surveys and questionnaires of participants, as well as in laboratory studies and evaluation results of an interregional research project carried out in 26 regions of the Russian Federation, made a substantial contribution to drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 06.04.2021;
accepted for publication 21.06.2021;
published 20.07.2021



Metabolome and exposome profiling of the biospecimens from COVID-19 patients in India

Shalini Aggarwal^{1*}, Shashwati Parihari^{1*}, Arghya Banerjee^{1*}, Jyotirmoy Roy^{2*}, Nirjhar Banerjee¹, Renuka Bankar¹, Saravanan Kumar³, Manisha Choudhury¹, Rhythm Shah⁴, Kharanshu Bhojak⁴, Viswanthram Palanivel¹, Akanksha Salkar¹, Sachee Agrawal⁵, Om Shrivastav⁵, Jayanthi Shastri⁵, Sanjeeva Srivastava^{1✉}

¹Department of Biosciences and Bioengineering, Indian Institute of Technology Bombay, Mumbai, India;

²Department of Chemical Engineering, Indian Institute of Technology Bombay, Mumbai, India;

³Thermo Fisher Scientific India | First Technology Place, Whitefield, Bangalore, India;

⁴Department of Metallurgical Engineering and Material Science, Indian Institute of Technology Bombay, Powai, Mumbai, India;

⁵Kasturba Hospital for Infectious Diseases, Chinchpokli, Mumbai, India

Abstract

Introduction. COVID-19 has become a global impediment by bringing everything to a halt starting from January 2020. India underwent the lockdown starting from 22nd March 2020 with the sudden spike in the number of COVID-19 patients in major cities and states. This study focused on how metabolites play a crucial role in SARS-CoV-2 prognosis.

Materials and methods. Metabolome profiling of 106 plasma samples and 24 swab samples from symptomatic patients in the Indian population of the Mumbai region was done. COVID-19 positive samples were further segregated under the non-severe COVID-19 and severe COVID-19 patient cohort for both plasma and swab.

Results. After analyzing the raw files, total 7,949 and 12,871 metabolites in plasma and swab were found. 11 and 35 significantly altered metabolites were found in COVID-19 positive compared to COVID-19 negative plasma and swab samples, respectively. Also, 9 and 23 significantly altered metabolites were found in severe COVID-19 positive to non-severe COVID-19 positive plasma and swab samples, respectively. The majorly affected pathways in COVID-19 patients were found to be the amino acid metabolism pathway, sphingosine metabolism pathway, and bile salt metabolism pathway.

Conclusion. This study facilitates identification of potential metabolite-based biomarker candidates for rapid diagnosis and prognosis for clinical applications.

Keywords: *plasma, swab, COVID-19, SARS-CoV-2, prognosis, biomarker candidate, metabolome, exposome, therapeutic target*

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Institute Ethics Committee, Indian Institute of Technology Bombay, and Institutional Review Board, Kasturba Hospital for Infectious Diseases (approval code IITB-IEC/2020/030).

Acknowledgments. The authors would like to acknowledge the active support from Prof. Ambarish Kunwar from the Department of Biosciences & Bioengineering to fabricate UV transport device for sample transport and Prof. Anirban Banerjee for the BSL-2 biosafety aspects is gratefully acknowledged. MASSFIIT (Mass Spectrometry Facility, IIT Bombay) from the Department of Biotechnology (BT/PR13114/INF/22/206/2015) is gratefully acknowledged for MS-based proteomics work. The authors also acknowledge the “Thermo Fisher Scientific” engineers and application scientists for their support to our MASSFIIT facility during the extreme lock-down time.

All the figures were created using Servier Medical Art templates, licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License.

Funding source. The study was supported through Science and Engineering Research Board, Department of Science & Technology, Ministry of Science and Technology, Government of India (SB/S1/Covid-2/2020), and a special COVID-19 seed grant (RD/0520-IRCCHC0-006) from IRCC, IIT Bombay to SS. The reported study was partially funded by RFBR according to the research project № 19-04-00088. The IIT Bombay fellowship supported Sh. Aggarwal and Sh. Parihari by the UAY-MHRD fellowship. Sh. Parihari was supported by CSIR. N. Banerjee is supported by DBT-JRF. A. Banerjee is supported by a CSIR fellowship, India.

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

For citation: Aggarwal Sh., Parihari Sh., Banerjee A., Roy J., Banerjee N., Bankar R., Kumar S., Choudhury M., Shah R., Bhojak Kh., Palanivel V., Salkar A., Agrawal S., Shrivastav O., Shastri J., Srivastava S. Metabolome and exposome profiling of the biospecimens from COVID-19 patients in India. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(4):397–415.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-161>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-161>

Метаболомное и экспосомное профилирование клинических образцов от пациентов с COVID-19 в Индии

Shalini Aggarwal^{1*}, Shashwati Parihari^{1*}, Arghya Banerjee^{1*}, Jyotirmoy Roy^{2*}, Nirjhar Banerjee¹, Renuka Bankar¹, Saravanan Kumar³, Manisha Choudhury¹, Rhythm Shah⁴, Kharanshu Bhojak⁴, Viswanthram Palanivel¹, Akanksha Salkar¹, Sachee Agrawal⁵, Om Shrivastav⁵, Jayanthi Shastri⁵, Sanjeeva Srivastava^{1✉}

¹Department of Biosciences and Bioengineering, Indian Institute of Technology Bombay, Mumbai, India;

²Department of Chemical Engineering, Indian Institute of Technology Bombay, Mumbai, India;

³Thermo Fisher Scientific India | First Technology Place, Whitefield, Bangalore, India;

⁴Department of Metallurgical Engineering and Material Science, Indian Institute of Technology Bombay, Powai, Mumbai, India;

⁵Kasturba Hospital for Infectious Diseases, Chinchpokli, Mumbai, India

Аннотация

Введение. COVID-19 стал глобальной проблемой начиная с января 2020 г. В Индии локдаун был введен 22 марта 2020 г. вследствие резкого роста числа пациентов с COVID-19 в крупных городах и штатах страны. Данное исследование посвящено изучению роли метаболитов в прогнозе исхода инфекции, вызываемой SARS-CoV-2.

Материалы и методы. Выполнено метаболомное профилирование 106 образцов плазмы и 24 образцов мазков от индийских пациентов с клиническими проявлениями инфекции, проживавших в регионе Мумбаи. Образцы плазмы и мазков пациентов с положительным результатом на COVID-19 были дополнительно разделены на две группы в соответствии с нетяжелым и тяжелым течением COVID-19.

Результаты. В результате анализа первичных данных были обнаружены 7949 и 12 871 метаболитов в образцах плазмы и мазков соответственно. По сравнению с COVID-19-отрицательными образцами в образцах плазмы и мазков от пациентов с COVID-19 были обнаружены 11 и 35 значительно изменённых метаболитов соответственно. Кроме того, в образцах плазмы и мазков от пациентов с тяжелым COVID-19 выявлены 9 и 23 метаболита соответственно, значительно изменённые по сравнению с образцами от пациентов с нетяжелым течением COVID-19. Обнаружено, что COVID-19 оказывает наибольшее влияние на метаболические пути, связанные с метаболизмом аминокислот, сфингозина и солей желчных кислот.

Заключение. Результаты данного исследования способствуют идентификации потенциальных кандидатов в биомаркеры на основе метаболитов для быстрой диагностики и прогноза в клинической практике.

Ключевые слова: плазма, мазок, COVID-19, SARS-CoV-2, прогноз, кандидатные биомаркеры, метаболом, экспосом, терапевтическая мишень.

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическими комитетами Indian Institute of Technology Bombay и Institutional Review Board, Kasturba Hospital for Infectious Diseases (код утверждения IITB-IEC/2020/030).

Благодарность. Авторы хотели бы выразить признательность профессору Ambarish Kunwar из Департамента биологических наук и биоинженерии за активную поддержку в изготовлении УФ-транспортного устройства для транспортировки образцов и профессору Anirban Banerjee за обеспечение биобезопасности уровня BSL-2. MASSFIIT (Mass Spectrometry Facility, IIT Bombay) из Департамента биотехнологии (BT/PR13114/INF/22/206/2015) проводили исследования по протеомике на основе MS. Авторы также выражают признательность инженерам и специалистам «Thermo Fisher Scientific» за их поддержку предприятия MASSFIIT во время экстремальной ситуации локдауна.

Все рисунки были созданы с использованием шаблонов Servier Medical Art под лицензией Creative Commons Attribution 3.0.

Источник финансирования. Исследование было поддержано Советом по научным и инженерным исследованиям Департамента науки и технологий Министерства науки и технологий правительства Индии (SB/S1/Covid-2/2020), а также специальным грантом по изучению COVID-19 (RD/0520-IRCCHC0-006) от IRCC, IIT Bombay для SS. Настоящее исследование частично финансировалось RFBR в соответствии с исследовательским проектом № 19-04-00088. Sh. Aggarwal и Sh. Parihari являются стипендиатами UAY-MHRD от IIT Bombay. Sh. Parihari был поддержан CSIR, N. Banerjee — DBT-JRF, A. Banerjee — стипендией CSIR, Индия.

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

Для цитирования: Aggarwal Sh., Parihari Sh., Banerjee A., Roy J., Banerjee N., Bankar R., Kumar S., Choudhury M., Shah R., Bhojak Kh., Palanivel V., Salkar A., Agrawal S., Shrivastav O., Shastri J., Srivastava S. Метаболомное и экспосомное профилирование клинических образцов от пациентов с COVID-19 в Индии. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2021;98(4):397–415.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-161>

Introduction

The SARS-CoV-2 virus in COVID-19 imitates febrile and respiratory diseases in humans such as influenza in various ways, including clinical symptoms, host immune response to viral infection, and virus transmission in the host body [1]. Clinical symptoms in these two respiratory diseases are quite similar which include mainly fever, chills, headache, muscle pain, tiredness, sore throat, stuffy nose, difficulty in breathing, and acute respiratory distress syndrome (ARDS) etc. [2, 3]. However, SARS-CoV-2 infection also results in dry coughs, anosmia or ageusia, aphonia, chest pain, skin rashes rarely, discoloration of fingers and toes, and organ failure [1, 3]. Organ failure has also been observed in risk-free, healthy individuals in case of long COVID-19 [4]. In COVID-19 cases, ARDS mostly affects patients with co-morbidities such as diabetes mellitus, hypertension, cancer, and kidney diseases [5, 6]. The diagnostic tests available for influenza are more robust, including rapid influenza diagnostic tests (RIDTs), RT-PCR molecular assays, and antibody-based immunofluorescent assays, whereas rapid diagnostic tests with high specificity and sensitivity in COVID-19 are awaited [1, 7].

Metabolites are another aspect using which one can diagnose or differentiate the diseased condition from a healthy one. Metabolites are easy to extract from the different sample sources and have been studied vastly for various diseases and disorders such as cancer [8], Lyme disease [9], tuberculosis [10], and pediatric autism spectrum disorders [11]. Metabolites are small biomolecules with less than 1,000 Da, which play a crucial role in managing pathways in any organism [12]. Metabolites meticulously act at all the stages of the central dogma and regulates various pathways [13, 14]. Therefore, a metabolomics study will help us better understand the mechanisms involved in the pathology of SARS-CoV-2. This can help in finding the potential targets for vaccination, drug exploration, or repurposing of FDA-approved drugs. There are various FDA-approved drugs available for the treatment of influenza respiratory disease, including amantadines, oseltamivir, laninamivir, and others [15]. However, there are no specified FDA-approved drugs available for COVID-19 treatment. However, due to the paucity of time and pandemic sequelae due to the virulent nature of the pathogen, scientists have looked into the repurposing of broad spectrum antibiotics, FDA-approved antibiotics such as hydroxychloroquine, azithromycin, and remdesiver [16–18]. Few animals based and *in vitro* studies have shown the positive effect of chloroquine against SARS-CoV [19–21] and avian influenza [22]. Hence, antimalarial FDA-approved drugs may have a synergistic effect with macrolides such as azithromycin in ablation of the viral pathology but lacks strong evidence *in vivo* system [23].

Furthermore, various chemicals and biomolecules from the environment have been reported to af-

fect the disease progression in synergy with genetic makeup and microbial load. Although human health is significantly dependent upon environmental exposures, the diversity and variation in exposures are poorly understood [24]. The visible gap in understanding the chemical-specific disease risks and human metabolic pathways indicates that a more global approach towards systems biology [25] is the need of the hour to expand beyond the endogenous metabolome to the exposome [26]. Exposomics reveals the exogenous chemicals an individual gets exposed to during his lifetime. As blood acts as the medium of transport for chemicals to and from the tissues, it also represents a reservoir of all endogenous and exogenous chemicals at a given time [27, 28]. Several reports have shown that the transmission of the SARS-CoV-2 virus and the disease progression in each individual depends on the infection characteristics such as viral load, prevalent co-morbidities, and the host of exposures belonging to the exogenous or endogenous human exposome domains [29, 30].

Therefore, in this study, along with a comprehensive metabolomics analysis of individual plasma and nasopharyngeal swab samples from COVID-19 patients with different severity of infection, we performed the blood exposome analysis. In the metabolomics study, we found the significantly altered and most frequently reported creatinine and indole-3-acetic acid in the COVID-19 severe sample cohort compared to COVID-19 non-severe sample cohort [31, 32]. Also, propionylcarnitine, monoglycerides and cis-stilbene oxide in the same plasma samples comparison but not frequently reported. We also found threo-sphingosine, phytosphingosine, myristamide, harniarin, butoctamide and 3-hydroxy-3-methylpentanedioic acid altered in swab samples of severe COVID-19 as compared to non-severe COVID-19 sample cohorts. We further carried out pathway analysis for understanding the role of significantly altered metabolites on various human biological pathways by using published data and our experimental data. The most consistent and recurring metabolites may form the basis for the future development of new prognostics and therapeutic intervention in a precise manner. In addition, we also report 3 significant blood exposomes (2-benzothiazolythio) acetic acid, tabun, contrastigmin, deoxymethyl-SA, which correlate with the metabolic pathways to differentiate the COVID-19 positive cohort COVID-19(+) from negative cohort COVID-19(–).

The aim of the present study was to analyze the alteration in the metabolite levels using an untargeted metabolomics approach in swab and plasma samples from patients with COVID-19. This study will provide significant knowledge on the underlying disease mechanism and the significantly altered metabolites can be potential candidate biomarkers for disease prognosis and serve as therapeutic targets.

Materials and methods

Sample and clinical details

In this study, the leftover plasma and swab samples collected for routine hematological tests and COVID-19 RT-PCR tests were collected from Kasturba Hospital, Mumbai. All samples were collected with the approval from the Institute Ethics Committee, IIT Bombay and Institutional Review Board, Kasturba Hospital for infectious diseases. Informed consent was not required as leftover samples from the routine tests were processed for the study. Patients with confirmed COVID-19 status based on RT-PCR test results were included in the study.

The inclusion criteria include:

- RT-PCR report positive and negative;
- severe and non-severity decided on basis of WHO guidelines.

The exclusion criteria considered were:

- a female patient who is pregnant at enrolling;
- patient aged below 18.

As advised by the clinicians, COVID-19(+) patients were categorized into non-severe (patients with mild fatigue, fever, cough, and breathlessness with non-invasive ventilation) — NSC and severe (patients with bilateral pneumonia and acute respiratory distress symptoms with mechanical ventilation support) — SC [33]. In total, 106 plasma samples and 24 swab samples were processed for metabolome profiling. The study cohort included plasma samples from 31 patients with COVID-19(–) patients, 43 NSC patients, and 29 samples from SC patients. Similarly, swab samples from COVID-19(–) patients ($n = 5$), NSC ($n = 9$) and SC ($n = 5$) were included in the study. The age, gender distribution, hematological parameters, and biochemical parameters of the patients enrolled in the study can be found in **Table 1**.

Samples were viral inactivated using ethanol, processed and stored at -20°C until transportation of the samples to the IIT Bombay campus in cold storage was conducted in a month duration. The sample preparation protocols for plasma and swab were optimized at IIT Bombay by referring to the viral inactivation method used in B. Shen *et al.* [34]. All the steps were performed in the BSL level 3 facility at the hospital.

Sample preparation from plasma and swab samples

The plasma and swab samples were prepared using the same methodology as K. Suvarna *et al.* [35], overview of the workflow can be referred in **Fig. 1**.

Basic data analysis was done using “Compound Discoverer 3.0” software (“Thermo Fisher”) with a threshold value of 100,000 for intensity marked as a signal. Experimental design, standard mix for instrumental general quality check (QC), and internal standards for sample preparation QC were also set.

The internal standards were added at two different time points:

- while preparing samples to check sample preparation quality;
- while injecting samples in the mass spectrometer (MS) to check instrument functionality while running a particular sample.

After the sample run, during data analysis, the first step was to check the coefficient of variance in all the run sets, followed by CV among all the samples in a run and then PCA analysis of all QC pools run with each set. If the CV was less than 30% among the sets or individual sample runs, then the data was considered good to be taken forward (**Fig. 2**). Also, proper segregation of QC pools for all the sets represented the proper execution of the experiment (**Fig. 3**). This included the addition of various adduct ions naturally present in the plasma, which might alter the ion formation of the metabolite targets in question. Hence the most abundant adduct ions were selected for the exploration of the target metabolites.

Mass spectrometry of plasma and swab metabolites

The extracted samples containing internal standard were analyzed using Ultraperformance Liquid Chromatography–High-Resolution Mass Spectrometry (UPLC–HRMS) methods with positive ion mode of Electrospray Ionization (ESI). Each sample was run in triplicates, where one run was set for MS/MS analysis for identification of the metabolites. The rest two runs for each sample were used as technical replicates for acquiring MS data of extracted metabolites. The resolution of the mass spectrometer was set at 140,000 for full MS and 17,500 for ddMS2 and scanned at a mass range 100–700 m/z . The capillary, probe, autosampler and column temperatures were 340°C , 380°C , 4°C and 40°C , respectively. Sheath Gas flow rate at 42, Aux Gas rate at 10, and spray voltage at 3.8 kV. A C18 column, i.e., Hypersil GOLD (100×2.1 mm, $1.9 \mu\text{m}$ particle size, “Thermo Fisher Scientific”, USA), was used in the UHPLC (Ultimate 3000) using water and 100% methanol as eluents both added with 0.1% formic acid, in a 20 mins gradient. The gradient consecutively reached 1% of methanol at 2 mins, 50% methanol at 5 mins, 98% methanol at 14 mins, stayed at 98% till 17 mins, 1% at 17.2 mins, and stayed at 1% methanol till 20 mins with a flow rate of 0.350 mL/min.

The samples were run in batches, and each sample was analyzed in three technical replicates using MS only and MS2 modes. Each batch of samples had initial blank runs consisting of 50% methanol, and a single blank was run after every sample. QC control samples consisting of a pool of samples were also run after every 5 samples to check the consistency of the instrument performance.

Statistical analysis

Analysis of acquired data was initially performed with the “Compound Discoverer 3.0” software (“Ther-

Table 1. Clinical information of the samples incorporated in the study

Parameter	Norm	Plasma samples			Swab samples		
		COVID-19(-)	NSC	SC	COVID-19(-)	NSC	SC
A. Patient information							
Number of participants		33	38	34	5 [#]	11 ^{##}	4
Age, years		50 (26–77)	52 (22–77)	56 (34–77)	43 (34–50)	53 (19–87)	55 (40–73)
B. Gender							
Males		20 (60.60)	23 (60.52)	20 (60.52)	2 (66.6)	7 (77.77)	2 (50)
Females		13 (39.39)	15 (39.47)	14 (39.47)	1 (33.3)	2 (22.22)	2 (50)
C. Patient status							
Discharged		30 (90.90)	35 (92.10)	19 (55.26)	3 (100)	9 (100)	2 (50)
Dead		0	2 (5.5)	15 (44.10)	0	0	2 (50)
Transfer/DAMA [‡]		3 (9.09)	1 (2.6)	0	0	0	0
Duration of hospital stay		50 (25–77)	10 (2–26)	23 (2–95)	4 (2–6)	7 (6–8)	18 (8–26)
Ventilation required		14 (30.43)	5 (13.18)	34 (100)	0	2 (2.22)	4 (100)
D. Hematological parameters							
Hemoglobin, g/dl		12.3 (8.7–16.6)	12 (5–14)	12 (7–15.4)	12.5 (10.4–15)	12.4 (9.4–15.7)	11.25 (10–13)
Polymorphs, %	40–75	71 (51–90)	68 (42–90)	78 (38–90)	65–87	73 (57–90)	77 (58–85)
Lymphocytes, %	20–40	29 (10–49)	31 (10–58)	21 (10–62)	24 (13–35)	26 (10–43)	24 (15–42)
Platelets, lakhs/ul	1.5–4.5	1.82 (0.76–4)	2 (1–4)	2 (0.4–4.2)	1.13 (0.7–1.8)	1.9 (1.4–2.9)	2
E. Biochemical parameters							
SGOT, U/L	0–40	60 (30–176)*	68 (20–440)**	52 (25–87)	44 (33–53)	40 (24–75)	45 (36–53)
SGPT, U/L	5–34	33 (12–82)*	44 (11–250)**	36 (16–75)	34 (29–42)	20 (14–34)	22 (10–42)
AlkPO ₄ , IU/L	15–112	80 (44–259)*	69 (34–102)**	70 (40–202)	40 (35–48)	65 (46–117)	57 (50–70)
Total bilirubin		0.8 (0.6–2)	1.9 (0.5–39.8)**	0.8 (0.6–1.4)	0.7 (0.7–0.8)	0.6 (0.6–0.8)	0.6 (0.6–0.8)
D. bilirubin, mg%	0–0.3	0.2 (0.2–0.9)	0.7 (0.2–17.1)**	0.2 (0.2–1.10)	0.3 (0.3–1)	0.2	0.2
Total protein, gm%	6–8.4	6.93 (6.20–7.90)	7 (6–8.2)	6.39 (5.3–7.6)	0.2 (0.2)	6.9 (6.2–8.1)	6.6 (5.9–7)
Albumin, gm%	3.2–5.0	3.65 (3.00–4.20)	3.53 (2.5–4.5)	3.27 (2.6–4.5)	3.6 (3.2–4)	3.7 (3.3–4.6)	3.1 (2.4–3.9)
Globulin, gm%	2.0–2.5	3.27 (2.5–4.1)	3.3 (2.5–4.5)	3.17 (2.4–4.4)	2.7 (2.5–3)	3.2 (2.8–3.5)	3.5 (3–4)
Sodium, mEq/l	133–146	136 (129–143)	136 (124–142)	135 (120–151)	135 (131–138)	135 (132–142)	135 (129–142)
Potassium, mEq/l	3.8–5.6	4.16 (2.7–6.8)	4.1 (3.2–5.2)	4.31 (2.8–8.2)	4 (3.4–4.5)	7.4 (3.6–33.0)	3.65 (3.2–4)
Blood urea nitrogen, mg%	6–21	15 (5–100)	13.2 (5–34)	26.8 (1.9–220.0)	1.2 (1.1–1.5)	12 (6–29)	17 (10–25)
Creatinine, mg%	1–2	1.27 (0.6–6.4)	1.17 (0.80–2)	1.48 (0.7–10.0)	1.4 (0.9–2.9)	1.2 (0.8–2.0)	1.15 (1–1.4)
D-dimer, ng FEU/ml	<500	N/A	N/A	2765 (10–15000)	N/A	N/A	2221 (1972–2471)
C-reactive protein, mg/l	<5	N/A	N/A	26.97 (0.9–88.8)	N/A	N/A	7.85 (4.2–11.5)
Ferretin, ng/ml	22–322	N/A	N/A	1286.4 (99.3–12098.0)	N/A	N/A	385.7 (209.5–538.9)
Interleukin-6, pg/ml	0–7.0	N/A	N/A	84.3 (4.6–441.0)	N/A	N/A	7.88 (6.73–9.04)

Note. *In COVID-19(-) plasma samples, 3 patients show an unusual increase in the clinical parameters due to the co-morbidities. Patient 261 had thyroid and 262 had hypertension.

**Plasma sample of one COVID-19(+), NSC patient showed unusual increase in the LFT parameters as the patient had autoimmune hepatitis.

No clinical data available for 2 patients from the COVID-19(-) group.

No clinical data available for 2 samples.

‡DAMA – discharged against medical advice.

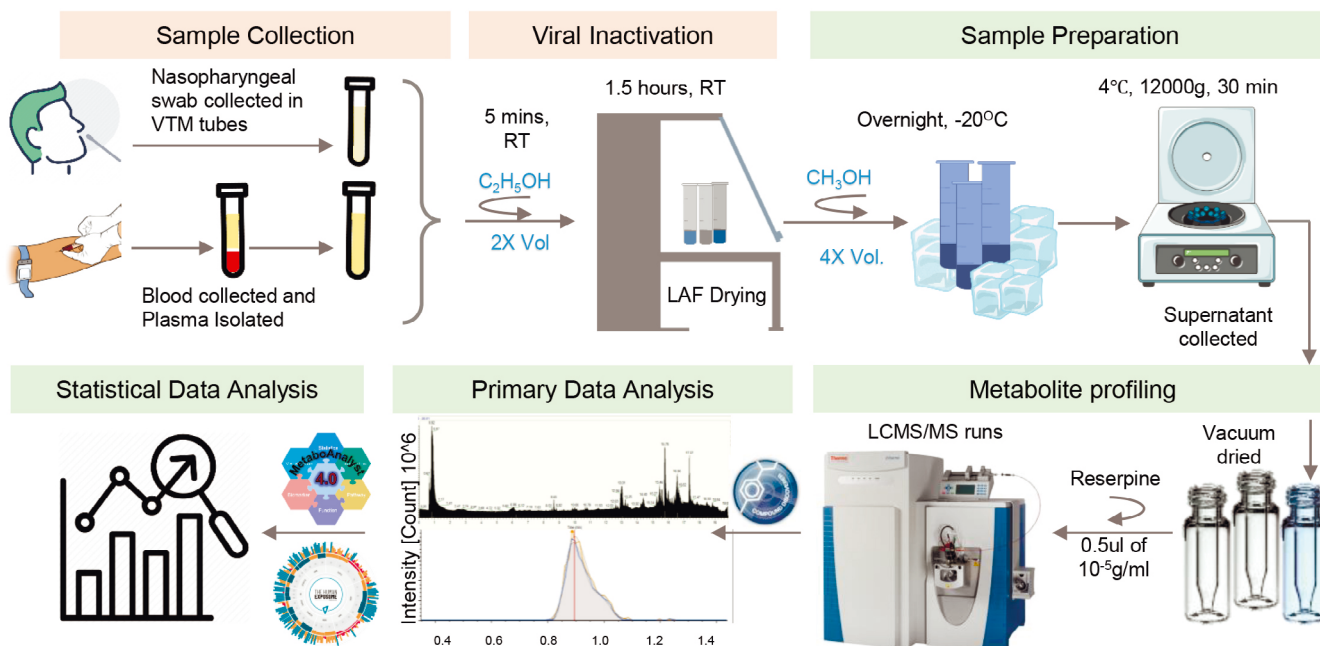


Fig. 1. Workflow of the metabolome profiling experiment using plasma and swab samples.

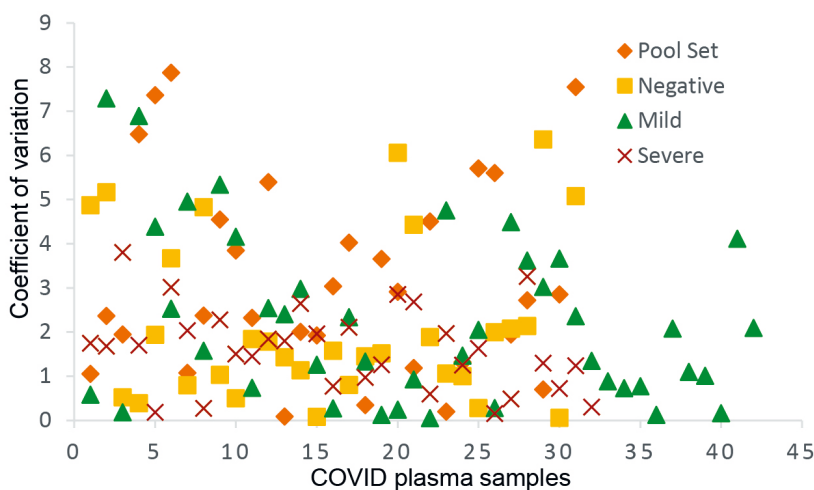


Fig. 2. Coefficient of variation of internal standard in COVID-19 plasma samples.

mo Fisher”) for metabolite identification/quantitation, chromatography peak alignment, mass spectrum visualization, and statistical analysis. The workflow template used in “Compound Discoverer 3.0” includes unknown compound detection, peak alignment, predicting the compound’s composition, and database searching against ChemSpider, which comprises of BioCyc, KEGG, and Human Metabolome Database (HMDB) with a mass tolerance of 5 ppm. For compound detection signal to noise ratio (S/N) was kept as 3, and the minimum peak intensity was 10^6 . To assign compound annotation on MS/MS level, three different data sources, such as mzCloud, ChemSpider, and Metabolika, with a mass tolerance of 5 ppm, were used [36]. All the duplicate runs were treated as individual samples in the data analysis.

The “Compound Discoverer 3.0” analyzed output had three types of metabolite representation:

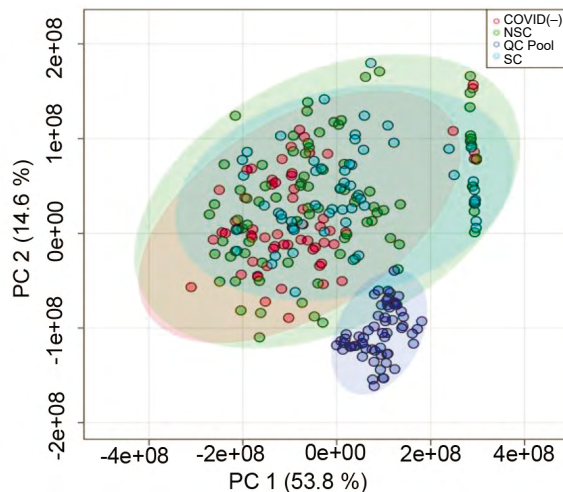


Fig. 3. PCA plot for all the plasma samples used in the study.

1. Metabolites with name, molecular formula, molecular mass, and retention time.

2. Metabolites without a name but with the molecular formula, molecular mass, and retention time.

3. Metabolites with molecular mass and retention time but no name and molecular formula.

No filtering was done at the beginning of the study to avoid loss of the data, and all the metabolites were given a code with the prefix “Meta_XX”.

The QC pools and internal standards were checked in different batches (**Fig. S1, A¹**) to decide the normalization and transformation strategy. Spearman correlation analysis of each cohort and all the samples was performed to check the data quality, and the samples having R^2 above 0.5 were considered for further post-processing. Also, the CV of the internal standard was checked across the set of samples and individual samples. The samples passing CV% <30 for internal standards were only used in the data analysis. The features with over 30% missing values were filtered out, and the missing value imputation was done separately for each cohort through KNN (k-nearest neighboring) in “Metaboanalyst 4.0” [37, 38]. The data was then log-transformed and median normalized, which was followed by a two-tailed unpaired student *t*-test for each pair of cohorts. The compounds having FDR adjusted *p*-value less than 0.05 and \log_2 fold change above 1.5 were considered statistically differentially expressed metabolites. The experimental MS/MS spectra of the significant metabolites were compared to available reference MS/MS spectra in METLIN and HMDB for MSI level annotation.

The significant metabolites were also checked for their correlation within sample cohorts and were analyzed using “Cytoscape 3.8.2” with Java 11.0.6 application based on pathway mapping against KEGG pathway library for *Homo sapiens*.

Exposome analysis

The list of all the unannotated metabolites post CD analysis was taken for exposome exploration analysis. The analysis was done for all COVID-19 patients from the three categories: negative, NSC, and SC. The unannotated metabolites from the list was taken and mapped on the blood exposome database. The basis of mapping exposomes was the molecular formula, which was the common parameter between the raw files and the blood exposome database. The compounds with redundant chemical formulas were removed from the database to avoid ambiguity, which lead to loss of data. Once the exposomes were discovered for each cohort of patients, then comparative analysis was done for the groups: COVID-19(+) vs. COVID-19(-), and NSC vs. SC. Subsequently, T-test and fold change analysis was

performed, and an exposome was considered statistically significant if it has *p*-value < 0.05 and fold change >1.5.

A detailed search was carried for all of the significantly altered exposomes to correlate them to various drugs, diseases and food habits. Relevant literatures were obtained from PubChem, PubMed, blood exposome database, US environmental protection agency website and DrugBank online. This information was correlated with the drugs and treatment administered to the patients to get an insight on how these compounds affect the biological pathways during the course of COVID-19.

Pathway analysis

The significant metabolites from both plasma and swab metabolite cohort were used to map the human metabolomics pathways. The list of the significant metabolites was subjected to “Metaboanalyst 4.0” under pathway analysis function. The metabolites mapped to HMDB IDs or KEGG IDs were segregated and the remaining unmapped metabolites were manually searched for their HMDB/KEGG ID. The final list of all the significant metabolites was again subjected to “Metaboanalyst 4.0” and pathways analysis using Fisher’s exact test as enrichment method, scatter plot for visualization, relative betweenness centrality for topology mapping, and SMPDB pathway library.

Results

The workflow of metabolome profiling for plasma and swab samples is shown in Fig. 1. The QC control and internal standard for all the plasma samples are shown in Figs. 2, 3. The proper segregation of COVID-19(+) and COVID-19(-) plasma samples are shown in **Figs. 4–6**. The proper segregation of COVID-19 NSC and SC plasma samples is shown in **Figs. 7–9**. The PCA plot for representing proper segregation of QC pools from all swab sample run is shown in **Fig. 10**. The proper segregation of COVID-19(+) and COVID-19(-) swab samples is shown in **Fig. 11**. The proper segregation of COVID-19 NSC and SC swab samples is shown in **Figs. 12–14**.

Plasma metabolome of COVID-19 patient cohorts

On analysis of COVID-19(-) and COVID-19(+) samples, 11 metabolites were found to be common yet significantly differentially expressed metabolites (DEMs) after blank subtraction, having FDR adjusted *p*-value less than 0.05 and fold change above 1.5 (**Table S1**). Of the 11, 3 metabolites — 1- α -glycerylphosphorylcholine, arachidonic acid and 1728235/monoacylglyceride — were found to be level-2 MSI (**Table 2**). The MS/MS spectra were matched with available online databases like MassBank of North America (MoNA) and HMDB. Dioctyltin, bis(4-ethylbenzylidene), sorbitol, 2210856, and 1728235 were level-3 MSI. Meta_2147, Meta_1992, and Meta_2701

¹ Supplemented materials see on the web page of the journal: <http://www.jmei.ru>

belong to level-4 MSI, whereas Meta_2208 and Meta_3308 were found to be level-5 MSI (Table S1).

The volcano plot shows 11 significantly altered metabolites in the COVID-19(+) and COVID-19(-) patient cohort; of these 5 metabolites are upregulated in the positive cohort and the rest 6 metabolites are downregulated (Fig. 4). These 11 metabolites were used to plot the PCA plot (Fig. 5) and heat map and showed the segregation of COVID-19(+) from COVID-19(-)

(Fig. 6). The box plots represent annotated metabolites i.e., 6 out of 11 significant DEMs (Fig. 4), and boxplots for unannotated metabolites are represented in Fig. S1, B).

A total of 24 significantly altered metabolites were found on comparing NSC with SC. Of the 24 significant metabolites, only 9 metabolites were found to be from samples and not contributed by blank. Propionylcarnitine, creatine, indole-3-acetic acid, glycochenode-

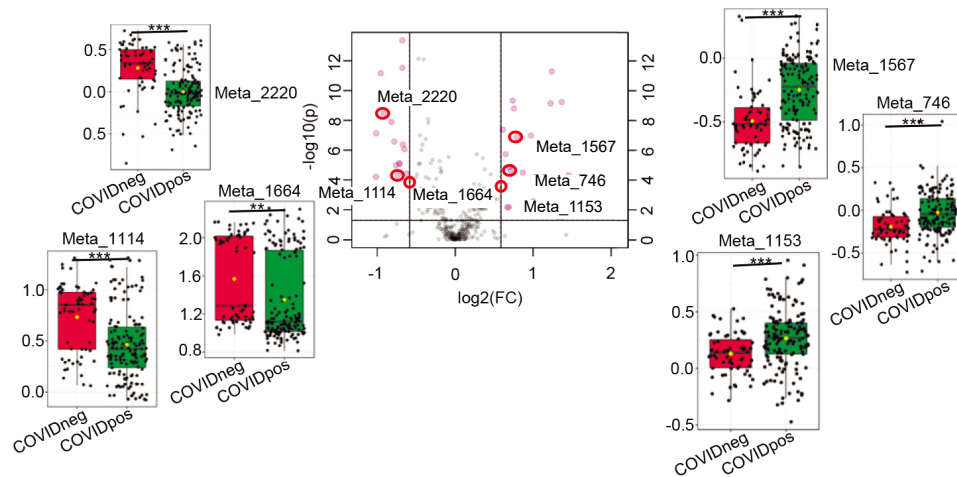


Fig. 4. Volcano plot representing the trend of significant metabolites in COVID-19(+) patients as compared to COVID-19(-) patients.

Table 2. List of significant metabolites from Plasma of COVID-19(-), mild and severe clinical cohorts

MSI level	Meta	Name	Pathways mapped to	Formula	RT	Log ₂ (FC)	FDR adjusted p value
List of differentially expressed metabolites in COVID-19(+) patients as compared to COVID-19(-) patients							
Level 2	Meta_746	l-Alpha-glycerolphosphorylcholine	Retinol metabolism	C ₈ H ₂₀ NO ₆ P	1.232	-0.72413	6.06E-05
Level 2	Meta_1153	Arachidonic acid	α-Linolenic acid and linoleic acid metabolism, arachidonic acid metabolism	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	20.047	-0.58732	0.000903
Level 2	Meta_1664	1728235/monoacylglyceride	–	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	19.949	0.59142	0.005183
Level 3	Meta_2220	Diocetyl tin	–	C ₁₆ H ₃₄ S	20.361	0.91546	1.31E-08
Level 3	Meta_1114	Bis(4-ethylbenzylidene)sorbitol	–	C ₂₄ H ₃₀ O ₆	13.395	0.74415	4.5E-06
Level 3	Meta_1567	2210856	–	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	20.131	-0.7918	3.39E-08
List of differentially expressed metabolites in NSC patients as compared to SC patients							
Level 2	Meta_222	Propionylcarnitine	Oxidation of branched chain fatty acids	C ₁₀ H ₁₉ NO ₄	1.263	0.82397	0.0001733
Level 2	Meta_1023	Creatine	Glycine, serine and threonine metabolism, arginine and proline metabolism	C ₄ H ₉ N ₃ O ₂	1.167	1.0631	2.1047E-05
Level 2	Meta_772	Indole-3-acetic acid	Tryptophan metabolism	C ₁₀ H ₉ NO ₂	8.539	-1.0757	8.9473E-05
Level 2	Meta_1664	1728235/monoacylglyceride	–	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	19.949	-1.682	0.035002
Level 2	Meta_820	Glycochenodeoxycholic acid	Bile acid biosynthesis	C ₂₆ H ₄₃ NO ₅	15.366	-1.7471	0.0052997
Level 2	Meta_1529	2-methylbutyrylcarnitine	–	C ₁₂ H ₂₃ NO ₄	7.252	0.63976	0.00021877
Level 3	Meta_613	MFCD00005122/Cis-stilbene oxide	–	C ₁₄ H ₁₂ O	12.98	2.341	1.6482E-05

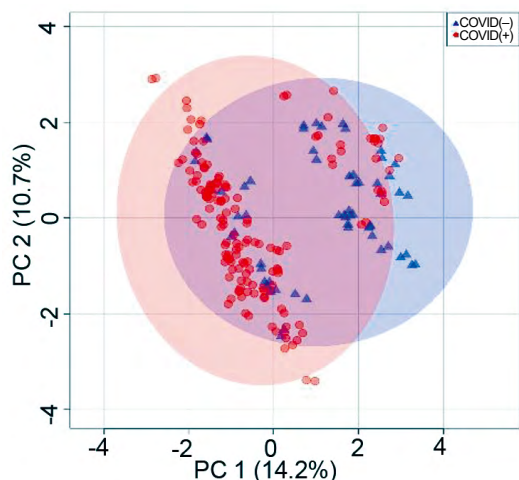


Fig. 5. PCA plot for COVID-19(+) and COVID-19(-) plasma samples.

oxycholic acid, 2-methylbutyrylcarnitine and 1728235/monoacylglyceride were found to be of level-2 MSI (Table 2). All the 6 metabolites were an almost exact match with 2 or more fragment spectral peak matching with HMDB spectral database. Level 3 needs confirmation. Meta_2040 and Meta_2446 were found to be of MSI 4 (Table S2). A PCA plot (Fig. 7) and heat map (Fig. 8) using these 9 metabolites shows the segregation of NSC from SC sample sets. The volcano plot showing 9 significantly altered metabolites in the NSC and SC patient cohort; out of which 4 metabolites are upregulated in the COVID-19(+) cohort and the rest 5 metabolites are down-regulated (Fig. 9). The box plots represent annotated metabolites i.e., 7 out of 9 significant DEMs (Fig. 9), and boxplots for unannotated metabolites are represented in Fig. S1, C.

Swab metabolome of COVID-19 patient cohorts

The PCA plot exhibited the proper segregation of QC pools from all the swab samples which suggests QC pass for sample run, shown in Fig. 10. The correlation matrix between COVID-19(+) and COVID-19(-) samples represented in Fig. S2, A-F. 30 metabolites were found to be significant DEMs in COVID-19(-) and COVID-19(+) swab samples having a *p*-value less than 0.05 and fold change above 1.5 (Table 3). Post blank

subtraction 29 significant metabolites were found significant. Out of the 29 metabolites, 7 metabolites were level-2 annotated: 2-isopropyl-N,2,3-trimethylbutanamide, Indane, 1,1'-sulfinyldibenzene, cyromazine, 4,7-dimethylbenzofuran, meglutol, and furfural diethyl acetal (Table 3). Rest of the 22 metabolites were level-4 annotated (Table S3). Furthermore, 5 and 1 metabolites were found significantly unique to COVID-19(+) and COVID-19(-) cohort, respectively. Of these, 3 metabolites were level-2 annotated (Table 3), and the rest were level-4 annotated (Table S3). The partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) plot was performed based on the 29 significant and non-contaminant classifiers to show the segregation between two cohorts (Fig. 11) and heat map preparation to show the segregation of COVID-19(+) from COVID-19(-) cohort (Fig. S2, H). The volcano plot shows 29 significantly altered metabolites in the COVID-19(+) and COVID-19(-) patient cohort; out of which 21 metabolites are upregulated in the COVID-19(+) cohort, and the rest 8 metabolites are down-regulated (Fig. S2, G). The box plots represent all the level 2 metabolites, i.e., 7 out of 29 significant DEMs are represented in Fig. S2, G, and the rest of the unannotated level 4 DEMs were listed in Table S3.

NSC and SC swab samples from COVID-19(+) patients' data analysis resulted in 34 features having a *p*-value less than 0.05 and fold change above 1.5 were considered statistically DEMs out of which 20 metabolites were found post blank subtraction. These 20 metabolites were used for PLS-DA plot (Fig. 12) and heat map preparation to show the segregation of NSC to SC sample sets (Fig. 13). Of the 12, 7 metabolites were level-2 annotated L-threo-sphingosine, phytosphingosine, myristamide, herniarin, 1,1'-sulfinyldibenzene, butoctamide, and meglutol (Table 3). Furthermore, 2 and 1 metabolites were found to be significantly unique to NSC cohort and SC cohort, respectively. Of these 2 metabolites were level-2 annotated (Table 3), and the remaining one was level-4 annotated. The volcano plot shows 20 significantly altered metabolites in the COVID-19(+) and COVID-19(-) patient cohort; of these 13 metabolites are upregulated in the NSC cohort and the rest 7 metabolites are down-regulated (Fig. 14).

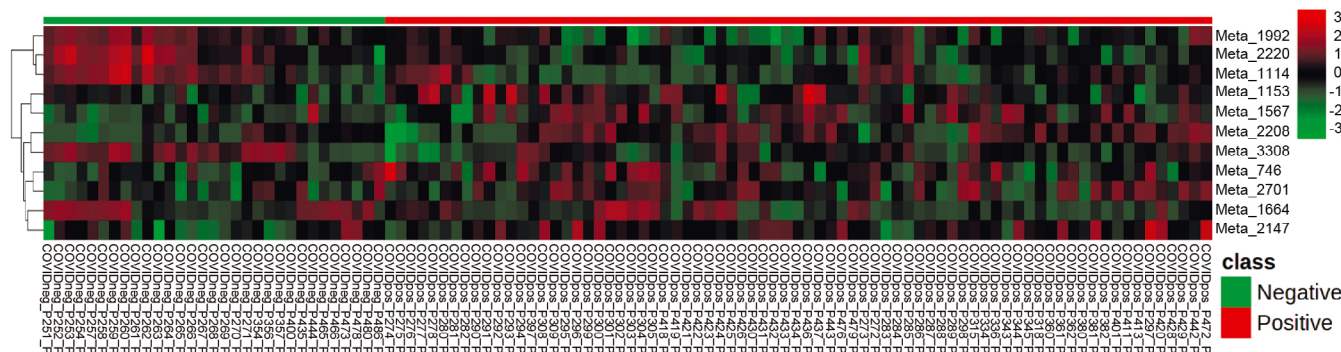


Fig. 6. Heat map of significantly altered metabolites in COVID-19(+) COVID-19(-) patient cohort.

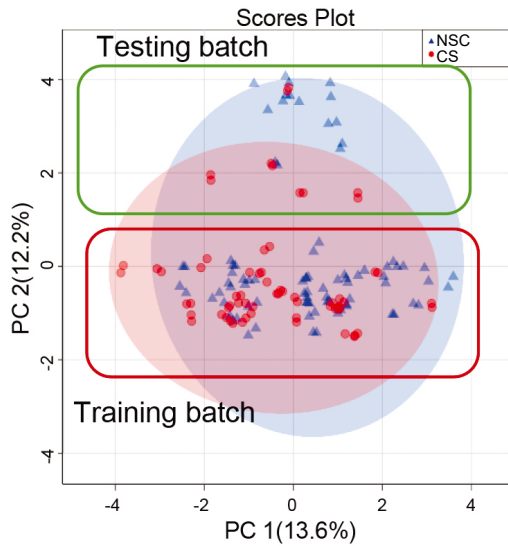


Fig. 7. PCA plot for NSC and SC plasma samples used in the study.

The box plots represent all the level-2 metabolites i.e., 7 out of 20 significant DEMs in Fig. 14, and the rest of the unannotated level-4 DEMs were listed in **Table S4**.

In case of COVID-19(-) cohort cyromazine, meglutol, 2-isopropyl-N,2,3-trimethylbutanamide, benzocyclopentane were found to be negatively correlated whereas, cyromazine, furfural diethyl acetal, 1,1'-sulfinyldibenzene, 2-isopropyl-N-2,3-triethylbutanamide, benzocyclopentane were found to be positively correlated. On one hand, herniarin, phytosphingosine, butoctamide and DA9185000 (1,1'-sulfinyldibenzene) were negatively correlated in NSC patient cohort. Whereas herniarin, threo-sphingosine, myristamide, 3-hydroxy-3-methylpentanedioic acid (meglutol) and butoactamide were found to be positively correlated in NSC sample cohort (**Fig. 15**). On the other hand, herniarin, threo-sphingosine, butoactamide, 3-hydroxy-3-methylpentanedioic acid, DA9185000 (1,1'-sulfinyldibenzene) were found to be negatively

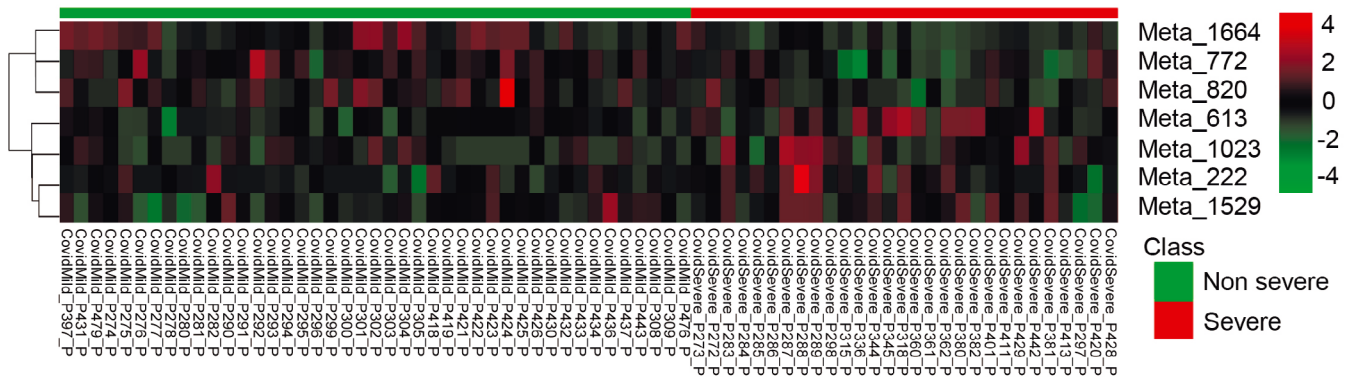


Fig. 8. Heat map of significantly altered metabolites in NSC and SC patient cohort.

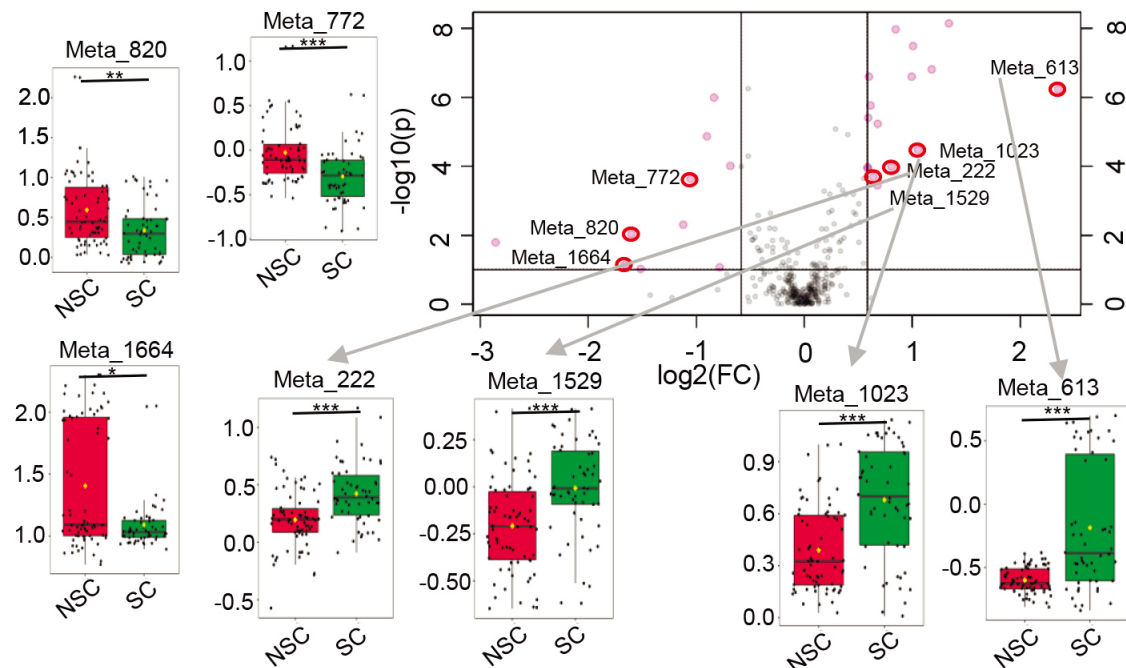


Fig. 9. Volcano plot representing the trend of significant metabolites in NSC patients as compared to SC patients.

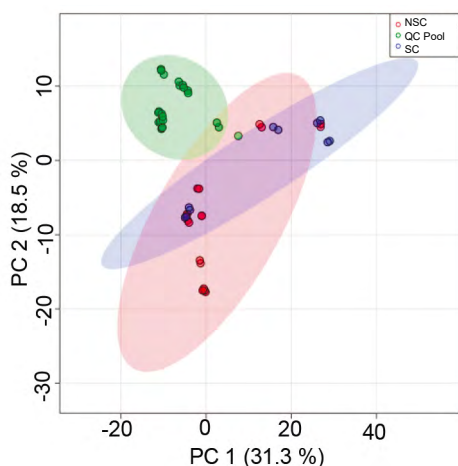


Fig. 10. PCA plot representing proper segregation of QC pools from all the batches for QC of swab sample runs.

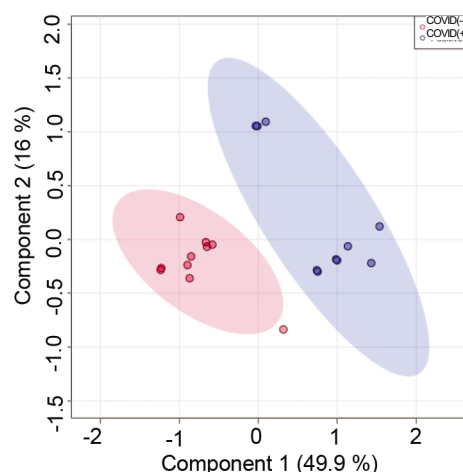


Fig. 11. PLS-DA plot of COVID-19(+) and COVID-19(-) patient cohort.

correlated in SC patient cohort. However, herniarin, butoamide, myristamide and 3-hydroxy-3-methylpentanedioic acid (meglutol), and phytosphongosine were positively correlated in SC patient cohort (Fig. 15).

Pathway analysis of plasma and swab based metabolome

Pathway analysis was done for all the significant metabolites with HMDB ID using “Metaboanalyst”

Table 3. List of significant metabolites from swab of COVID-19(-), NSC and SC cohorts

List of expressed metabolites in COVID-19(+) patients as compared to COVID-19(-) patients							
Level	MetaCode	Name	Formula	Retention time	Log ₂ (FC)	Raw p value	Type
Level 2	Met_685	1,2,6-Hexanetriol	C ₆ H ₁₄ O ₃	6.888	N/A	N/A	Pos
Level 2	Met_712	2-isopropyl-N,2,3-trimethylbutanamide	C ₁₀ H ₂₁ NO	11.832	0.58598	0.035932	DEM
Level 2	Met_864	γ-Glu-leu	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₅	7.322	N/A	N/A	Neg
Level 2	Met_984	Indane	C ₉ H ₁₀	14.989	0.69573	0.008432	DEM
Level 2	Met_1820	1,1'-Sulfinyldibenzene	C ₁₂ H ₁₀ OS	1.313	-0.70988	0.01936	DEM
Level 2	Met_1898	Cyromazine	C ₆ H ₁₀ N ₆	8.787	-0.74273	0.02086	DEM
Level 2	Met_2641	4,7-Dimethylbenzofuran	C ₁₀ H ₁₀ O	14.988	0.596	0.00392	DEM
Level 2	Met_2709	Meglutol	C ₆ H ₁₀ O ₅	1.277	-0.65851	0.03299	DEM
Level 2	Met_2934	(S)-ATPA	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₄	10.836	N/A	N/A	Pos
Level 2	Met_3339	Furfural diethyl acetal	C ₉ H ₁₄ O ₃	7.779	-0.69864	0.00442	DEM

List of DEMs in NSC patient cohort as compared to SC patients							
Level	MetaCode	Name	Formula	Retention time	Log ₂ (FC)	FDR adjusted p value	Type
Level 2	Met_250	L-Threo-sphingosine	C ₁₈ H ₃₇ NO ₂	13.761	-0.78405	0.0135	DEM
Level 2	Met_372	2,3-Naphthalenediol	C ₁₀ H ₈ O ₂	8.817	N/A	N/A	NSC
Level 2	Met_414	Phytosphingosine	C ₁₈ H ₃₉ NO ₃	15.276	-0.6108	0.03107	DEM
Level 2	Met_534	1-Octadecanamine	C ₁₈ H ₃₉ N	18.086	N/A	N/A	SC
Level 2	Met_719	Myristamide	C ₁₄ H ₂₉ NO	17.632	1.2395	0.0135	DEM
Level 2	Met_1163	Herniarin	C ₁₀ H ₈ O ₃	10.888	0.63285	0.00518	DEM
Level 2	Met_1960	1,1'-Sulfinyldibenzene	C ₁₂ H ₁₀ OS	1.317	-0.67829	0.0135	DEM
Level 2	Met_2189	Butoamide	C ₁₆ H ₂₉ NO ₅	7.383	2.0833	0.04522	DEM
Level 2	Met_2926	Meglutol	C ₆ H ₁₀ O ₅	1.284	-1.0558	4E-05	DEM

Note. Neg — uniquely expressed metabolites in COVID-19(-) patients; Pos — uniquely expressed metabolites in COVID-19(+) patients; NSC — uniquely expressed metabolites in NSC patients; SC — uniquely expressed metabolites in SC patients.

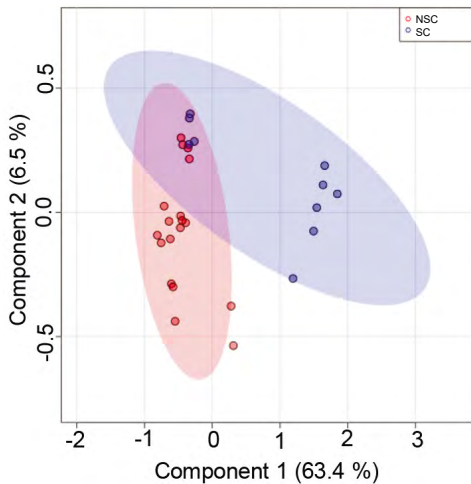


Fig. 12. PLS-DA plot of NSC and SC patient cohort.

and 1- α -glycerylphosphorylcholine was found to be enriched in the retinol pathway, and arachidonic acid was mapped to α -linolenic acid and linoleic acid meta-

bolism, arachidonic acid metabolism (*Table S1*). Diocetyltn, bis(4-ethylbenzylidene)sorbitol and arachidonic acid were positively correlated and 1- α -glycerylphosphorylcholine, bis(4-ethylbenzylidene)sorbitol and dioctyltn were negatively correlated in the COVID-19(-) patients. However, all the 4 metabolites were found to be positively correlated in the COVID-19(+) patient cohort. Furthermore, in COVID-19(+) patients, correlation was analyzed between NSC and SC patient cohorts.

Creatine and glycochenodeoxycholic acid along with diethylhexyl adipate, 1-monopalmitoylglycerol, acetyltributyl citrate and 10-hydroxmatricaric acid with cis-stilbene oxide were found to be negatively correlated in SC patient cohort. Funtumine, diethylhexyl adipate, DL-propylene glycol dibenzoate and acetyl tributyl citrate were found to be positively correlated in SC cohort.

On the other hand, diethylhexyl adipate, cis-stilbene oxide, DL-propylene glycol dibenzoate, funtumine, and 2-methylbutyroyl carnitine were found to

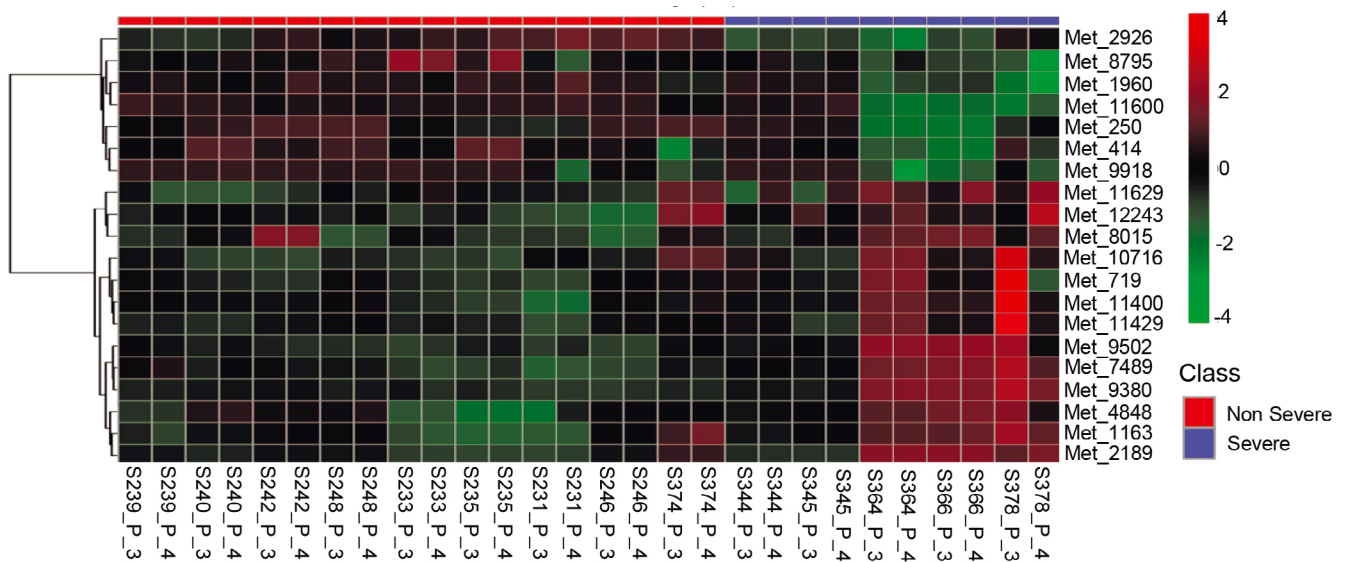


Fig. 13. Heat map of significantly altered metabolites in non-severe and severe COVID-19 patient cohort.

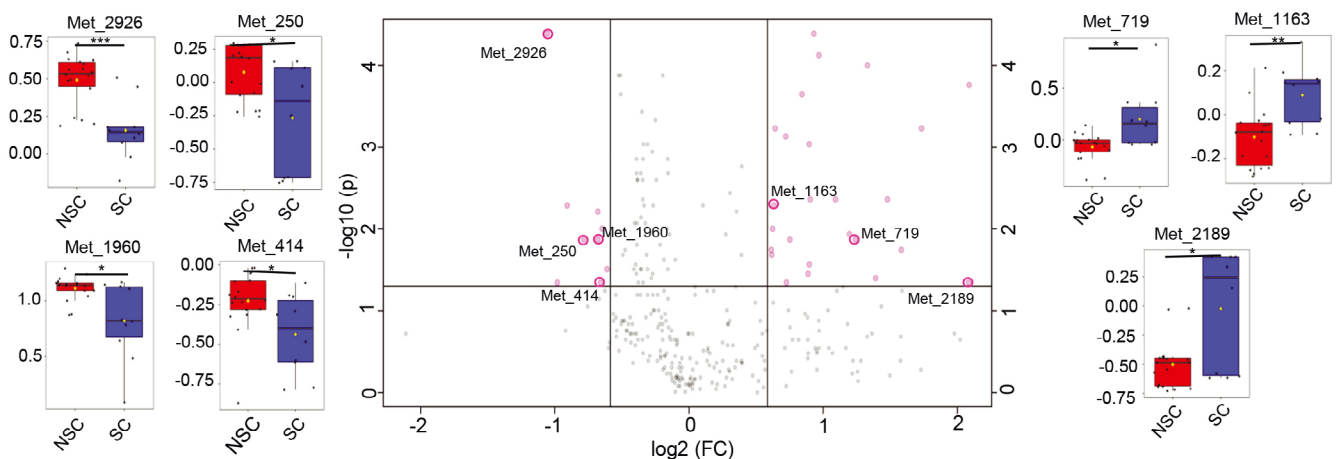


Fig. 14. Volcano plot representing the trends of significantly altered metabolites, level 2 MSI, in NSC and SC patient cohort.

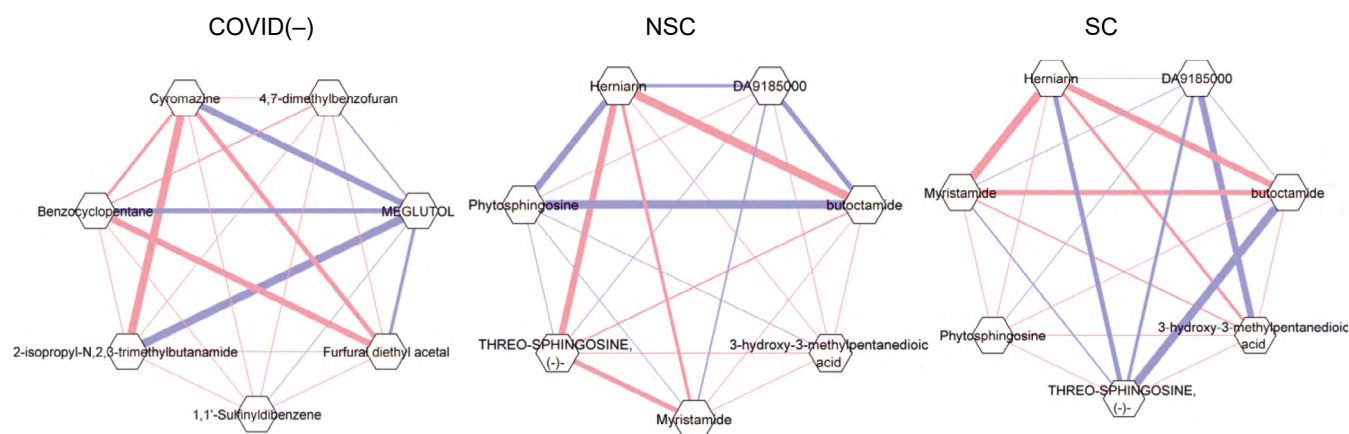


Fig. 15. Correlation among the significantly altered metabolites in the COVID-19(-) samples and COVID-19(+) swab samples (NSC and SC).

be negatively correlated in NSC patient cohort. However, diethylhexyl adipate, funtumine, acetyl tributyl citrate, and DL-propylene glycol dibenzoate were found to be positively correlated same as the SC patient cohort (**Fig. 16**). Propionylcarnitine was found enriched in oxidation of branched chain fatty acids pathway, indole-3-acetic acid was enriched and mapped to tryptophan metabolism pathway, creatine was enriched and mapped to glycine, serine, threonine, arginine, and proline metabolism pathway. Also, glycochenodeoxycholic acid was mapped to bile acid biosynthesis pathway (**Fig. 17** and *Table S2*).

be differentially expressed in COVID-19(+) compared to COVID-19(-) patients (*Table S5*). Out of these 11 exposomes, 4 were found statistically significant with a fold change of greater than 1.5 and *p*-value of less than 0.05. These 4 compounds are: tabun, (2-benzothiazolylthio) acetic acid, contrastigmin, and deoxymethyl-SA. Out of these 4 compounds, 3 compounds (tabun, (2-benzothiazolylthio) acetic acid, and contrastigmin) were upregulated in COVID-19(+) patients as compared to COVID-19(-) patients. Two compounds (contrastigmin and deoxymethyl-SA) were downregulated in SC patients as compared to NSC patient cohort.

Exposomes analysis

After doing the exposomic analysis by mapping the unannotated metabolites from the raw data with the blood exposome database, 11 exposomes were found to

Discussion

We observed a drop in the number of annotated and significant metabolites but the metabolites obtained after this set pipeline were consistent with those pub-

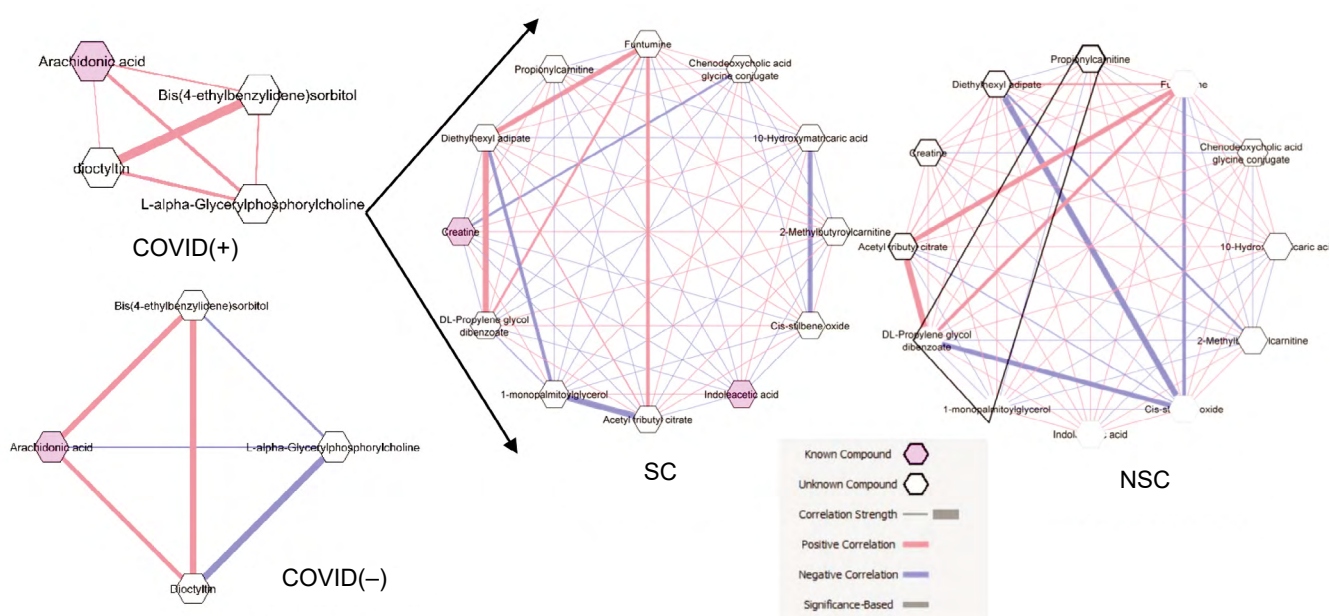


Fig. 16. Correlation among significantly altered metabolites in the COVID-19(-) samples and COVID-19(+) samples (NSC and SC).

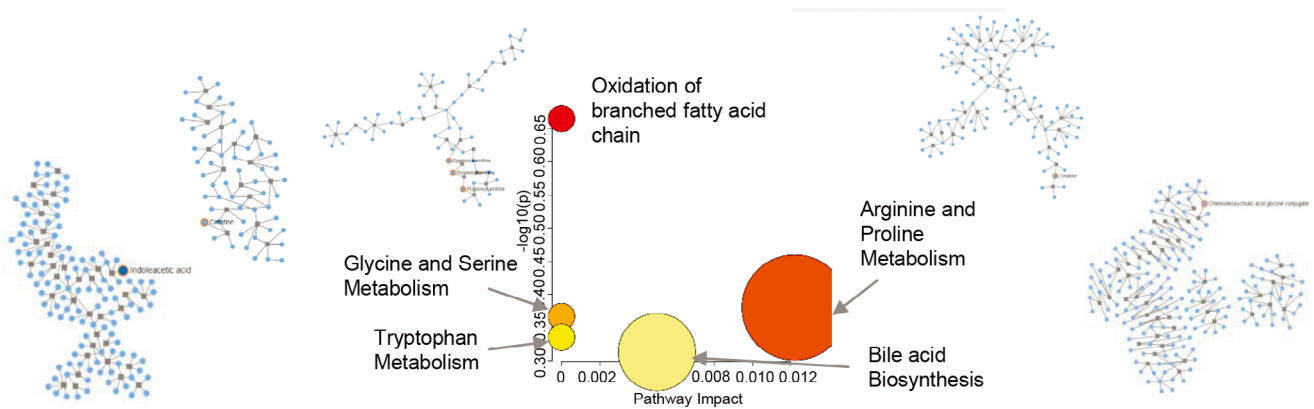


Fig. 17. Pathway analysis of significant metabolites from plasma and swab specimens extracted from NSC and SC patients.

lished works of literature in the context of COVID-19 biology related to the clinical manifestations. Hence, the significant metabolites were explored in the literature for the trend of their alteration in SC and NSC patients (**Tables S6** and **S7**).

Plasma metabolome understanding

The upregulation of propionylcarnitine is reported to be significant in the SC patients as compared to the NSC patient cohort, in the alteration of the carnitine pathway (**Fig. 18**) [39–41]. Creatine plays a crucial role in the metabolism of amino acids such as glycine, serine, threonine, arginine, and proline. The upregulation of creatine levels in SC cohort suggests the alteration in amino acid metabolism (**Fig. 18**) [39, 41–43]. The significantly altered metabolite capturing can be used for the rapid prognosis of the severity of the COVID-19 condition in patients with co-morbidity for efficient healthcare. Another significant metabolite, indole acetic acid, a byproduct generated due to tryptophan metabolism, is engendered by the modification of tryptophan. However, due to the decrease in tryptophan levels in COVID-19 patients [42], the level of indole acetic acid might be lower than that in COVID-19(–) patients.

Additionally, the conjugate of bile acid-glycine and acyl glycine gives rise to chenodeoxycholic acid glycine conjugate. Most of the bile acids are conjugated with glycine to facilitate fat absorption by solubilization of the fat [44]. The significant downregulation of chenodeoxycholic acid glycine conjugate (**Fig. 18**) might help in an increase in fat accumulation and imbalance of sodium salt balance [44] in the infected patients prognosing the disease severity in patients with co-morbidities like high cholesterol, hypertension, or heart conditions due to fat accumulation. Additionally, a drug repurposing study unraveled the possibility of chenodeoxycholic acid glycine conjugate/glycochenodeoxycholic acid to be a potential inhibitor of SARS-CoV-2 spike protein RBD which helps in the invasion through ACE2 receptor binding domain [45]. Hence,

decrease in chenodeoxycholic acid glycine conjugate/glycochenodeoxycholic acid in the COVID-19(+) patients favors the higher chances of SARS-CoV-2 invasion.

Swab metabolome understanding

In metabolite profiling of swab biospecimens from COVID-19(–), NSC and SC patient, alterations in the phospholipid, fatty acids, sphingomyelins, glycerophospholipids have been reported by B. Yan *et al.* [46]. Alteration in these lipids occurs due to the membrane rearrangement during COVID-19 virus replication in the host. Downregulation of the glycerophospholipids and phospholipids in the case of COVID-19 patients have already been identified in the case of plasma samples [47]. In the case of community-acquired pneumonia (CAP), the level of phospholipids in plasma is low due to the invasive microorganism infection in the host body [48]. Also, the alteration in the oleic acid and arachidonic acid is leading towards the severity cases in COVID-19 patients [46, 49].

In our study, we found that the progression from NSC to SC causing the downregulation of l-threo-sphingosine and phytosphingosine. Sphingosines are the precursors of the sphingolipids present in the cell membrane which helps in the cell permeability and mainly helps in the synthesis of ceramide. L-threo-sphingosine is a stereoisomer of sphingosine which acts as the protein kinase C inhibitor in the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway [50]. It plays a major role in the induction of apoptosis by inhibiting cell proliferation via inhibition of the MAPK pathway. Phytosphingosine belongs to the sphingolipid family which is found in yeast, plants, and also in mammals. Phytosphingosine possess an extra hydroxyl group at C-4 in comparison to other sphingosine long-chain bases. In the cell, an odd number of fatty acids integrate to form glycerophospholipids obtained from phytosphingosine [51]. These phospholipids are the major component of the cell membrane, which involves various cellular processes such as cell proliferation, cell signaling, cell-cell

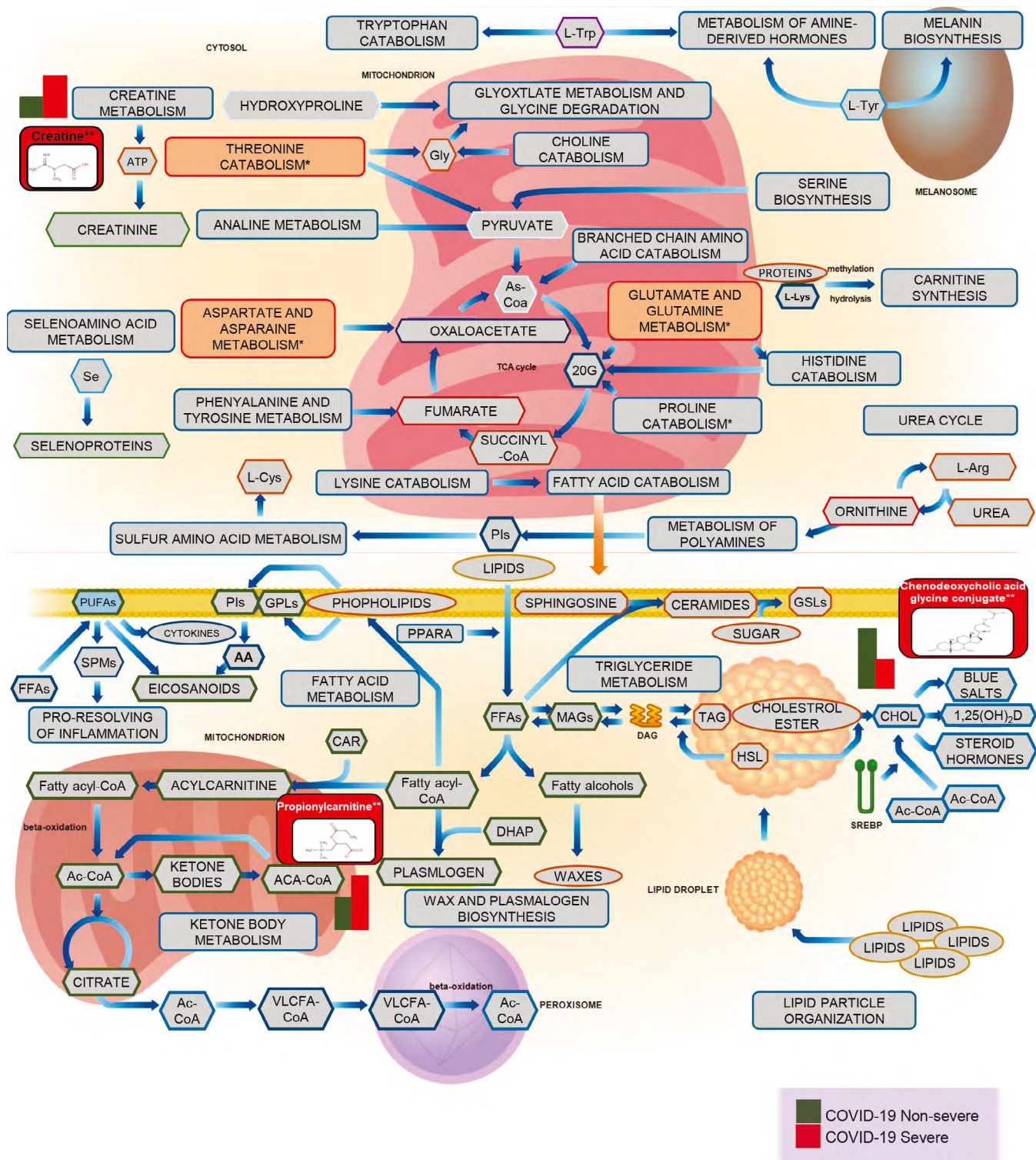


Fig. 18. Pathway analysis of significant metabolites from plasma and swab specimens extracted from NSC and SC patient cohort.

- A. Oxidation of branched fatty acid pathway mapping propionylcarnitine. The propionylcarnitine was found to be overexpressed as compared to non-severe patients;
 - B. Bile acid biosynthesis pathways mapping the chenodeoxycholic acid glycine conjugate and found to be overexpressed in the non-severe patients;
 - C. Arginine and proline synthesis pathway mapping creatine. Creatine was found to be overexpressed in the severe patients as compared to non-severe patients.
- The mapped metabolites from the study are highlighted in red, blue highlights are the interacting biomolecules to result in alteration of the effected pathways.

interaction, and cell apoptosis. Like 1-threo-sphingosine, phytosphingosine plays a major role in cell apoptosis. Phytosphingosine induces the mitochondria to release caspase-independent cytochrome c which helps apoptosis of T-cell lymphocytes in mammals [52].

It has been shown that upregulation of fatty acids in the body shows a host response against the virus due to activation of a defense mechanism in the host body. These fatty acids are also involved in inflammation which regulates the levels of cytokines in the body. Due to the invasive microorganism host body develops a defense mechanism that induces the release of cytokines, leading to the formation of unsaturated fatty acids in the host body [53]. In our study, we found myristamide to be upregulated in the case of SC patients. Myristamide is an amide form of myristic acid, which is derived from a tetra decanoic acid [54]. On comparing the non-severe with SC cohort, meglutol also known as 3-hydroxy-3-methylpentanedioic acid is downregulated in SC patients. It is a dicarboxylic acid, which is a derivative product of glutaric acid. Meglutol is mainly involved in the transformation of acetate to hydroxymethylglutaryl coenzyme A which lowers the phospholipid level [55].

Role of exposome in COVID-19

Exposomes are the compounds that we get exposed to during our daily life and living habits such as medicinal drugs, food supplements, habits such as smoking, chewing tobacco or consuming alcohol, and any other exposome from the environment that is not found naturally the human system. Exposome-wide association studies have shown a novel approach towards understanding the relationships of several chemical and non-chemical exposures in the progression of human diseases over the course of life and possibly across generations [56, 57]. In case of infectious diseases, the compiled description and evaluation of the exposome components can help in tailoring and evaluation of health disparities and other risk factors (e.g. co-exposure to chemicals, pollution *etc.*) [58]. In this study, we have attempted to identify few exogenous metabolites significant in COVID-19 utilizing a new data analysis method to comprehensively understand COVID-19 pathogenesis in relation to the external environment.

One of the significant blood exposome observed in severe COVID-19 patients is tabun, which is related to cholinesterase inhibitors drugs. The neurotransmitter acetylcholine is hydrolyzed, and thereby inactivated, by cholinesterases [59]. Another exogenous compound (2-benzothiazolylthio) acetic acid has also been observed to be significantly altered in severe patients. It was very interesting to note that benzothiazole derivatives have been reported to be a compound of exogenous origin and used as fungicides, corrosion inhibitors, and vulcanization accelerators in industry [60]. Contrastigmin, also known as pralidoxime methyl

sulfate, is a constituent of antidotes: cholinesterase re-activators. These compounds are an important component of therapy in agricultural, industrial, and military poisonings by organophosphates and sulfonates [61]. Also, we observed deoxymethyl-SA, also known as 1-deoxymethylsphinganine, is a compound of endogenous origin and is related to the sphingolipid metabolic pathways [62].

The major focus for conducting this analysis was several unannotated compounds after annotating the data using CD. The probable reason is the existence of several compounds in the samples which are not directly involved in metabolic pathways in the human body, unreported byproducts or compounds of exogenous origin which are not included in HMDB. These compounds can be explored by incorporating databases like blood exposome and other exposomics databases, which will consider the various compounds that a person is exposed to in the environment. In this study, the differential expression of these compounds was studied among various COVID-19 patients to get an insight into potential markers for this disease that may not be directly involved in any biological pathway but exists in the blood due to the dynamic external environment the individual is exposed. However, the major constraints of the study were the small patient dataset and detailed clinical data were not available for all of the patients.

The findings and observations from this study may be used to modulate the altered pathways as therapeutic agents or for diagnostics and prognostic purposes. Metabolites being highly dynamic and major driving molecules of the disease pathways may lead clinicians to early detection of the disease for efficient treatment resulting reduced rate of mortality due to COVID-19.

Future perspective

The significant metabolites reported in this study are the primary and most recurring metabolites as per our datasets and published literature. One of the major unresolved factors is the role of co-morbidities in the COVID-19 severe or vulnerable patient cohort. The pandemic outbreak pattern revealed that the population vulnerable to the virus was the elderly and the comorbid patients. The vulnerable cohort faced the severe form of the disease to the maximum extent [63]. However, a clear map of the pathways involved in the co-morbidity-related severity in the vulnerable patients remains unraveled. Additionally, exposomes become a part of one's metabolome and may modulate the immune system efficiency in the long term. Various reports have favored the role of one's exposome on one's immunity or vulnerability towards a disease [64–66]. Hence, a deeper insight into the exposomes of not only blood but also other biospecimens will provide much more comprehensive understanding of the various exogenous and endogenous factors that contribute towards

disease severity. Information about the factors and pathways leading to severity might provide a better direction for clinicians to treat and control the pandemic. The co-morbidities suspected to synergize the disease prognosis are majorly lifestyle-based and may have the role of exposures one goes through in their daily lives. Hence, prompting the need for co-morbidity-based studies by systematic cohort recruitment, well-defined inclusion, and exclusion criteria. This will enhance the understanding of the disease pathogenesis with respect to age, race, gender, genetic makeup, and co-morbidities involved.

Data and materials availability

All processed data associated with this study are present in the article or in the supplementary materials on the web page of the journal. Raw data will be available on Metabolights MTBLS2291 and MTBLS2349 for plasma and swab raw files, respectively.

REFERENCES

1. Elsevier. Novel Coronavirus Information Center. Available at: <https://www.elsevier.com/connect/coronavirus-information-center>
2. Clark N.M., Lynch J.P. Influenza: epidemiology, clinical features, therapy, and prevention. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2011; 32(4): 373–92. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1283278>
3. Wan S., Xiang Y., Fang W., Zheng Y., Li B., Hu Y., et al. Clinical features and treatment of COVID-19 patients in northeast Chongqing. *J. Med. Virol.* 2020; 92(7): 797–806. <https://doi.org/10.1002/jmv.25783>
4. Iacobucci G. Long Covid: Damage to multiple organs presents in young, low risk patients. *BMJ.* 2020; 371. <https://doi.org/10.1136/bmj.m4470>
5. Wang D., Hu B., Hu C., Zhu F., Liu X., Zhang J., et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA.* 2020; 323(11): 1061–9. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.1585>
6. Zhou F., Yu T., Du R., Fan G., Liu Y., Liu Z., et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: A retrospective cohort study. *Lancet.* 2020; 395(10229): 1054–62. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30566-3)
7. Merckx J., Wali R., Schiller I., Caya C., Gore G.C., Chartrand C., et al. Diagnostic accuracy of novel and traditional rapid tests for influenza infection compared with reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Ann. Intern. Med.* 2017; 167(6): 394–409. <https://doi.org/10.7326/M17-0848>
8. Wu L., Qu X. Cancer biomarker detection: recent achievements and challenges. *Chem. Soc. Rev.* 2015; 44(10): 2963–97. <https://doi.org/10.1039/C4CS00370E>
9. Pegalajar-Jurado A., Fitzgerald B.L., Islam M.N., Belisle J.T., Wormser G.P., Waller K.S., et al. Identification of urine metabolites as biomarkers of early Lyme disease. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 12204. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29713-y>
10. Weiner J., Maertzdorf J., Sutherland J.S., Duffy F.J., Thompson E., Suliman S., et al. Metabolite changes in blood predict the onset of tuberculosis. *Nat. Commun.* 2018; 9(1): 5208. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07635-7>
11. Kang D.W., Ilhan Z.E., Isern N.G., Hoyt D.W., Howsmon D.P., Shaffer M., et al. Differences in fecal microbial metabolites and microbiota of children with autism spectrum disorders. *Anaerobe.* 2018; 49: 121–31. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.12.007>
12. Nalbantoglu S. Metabolomics: basic principles and strategies. *Mol. Med.* 2019. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88563>
13. Franklin, S., Vondriska T.M. Genomes, proteomes, and the central dogma. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2011; 4(5): 576. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.110.957795>
14. Nägele T. Linking metabolomics data to underlying metabolic regulation. *Front. Mol. Biosci.* 2014; 1: 22. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2014.00022>
15. Allen U.D., Aoki F.Y., Stiver H.G. The use of antiviral drugs for influenza: recommended guidelines for practitioners. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 2006; 17(5): 273–84. <https://doi.org/10.1155/2006/165940>
16. Colson P., Rolain J.M., Lagier J.C., Brouqui P., Raoult D. Chloroquine and hydroxychloroquine as available weapons to fight COVID-19. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2020; 55(4): 105932. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105932>
17. Gautret P., Lagier J.C., Parola P., Hoang V.T., Meddeb L., Mailhe M., et al. Hydroxychloroquine and azithromycin as a treatment of COVID-19: Results of an open-label non-randomized clinical trial. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2020; 56(1): 105949. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105949>
18. Grein J., Ohmagari N., Shin D., Diaz G., Asperges E., Castagna A., et al. Compassionate use of remdesivir for patients with severe Covid-19. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(24): 2327–36. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2007016>
19. Savarino A., Di Trani L., Donatelli I., Cauda R., Cassone A. New Insights into the antiviral effects of chloroquine. *Lancet Infect. Dis.* 2006; 6(2): 67–9. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70361-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70361-9)
20. Vincent M.J., Bergeron E., Benjannet S., Erickson B.R., Rollin P.E., Ksiazek T.G., et al. Chloroquine is a potent inhibitor of SARS coronavirus infection and spread. *Virology.* 2005; 2: 69. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-2-69>
21. Touret F., de Lamballerie X. Of chloroquine and COVID-19. *Antiviral Res.* 2020; 177: 104762. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104762>
22. Yan Y., Zou Z., Sun Y., Li X., Xu K. F., Wei Y., et al. Anti-malaria drug chloroquine is highly effective in treating avian influenza A H5N1 virus infection in an animal model. *Cell Res.* 2013; 23(2): 300–2. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.165>
23. Gautret P., Lagier J.C., Parola P., Hoang V.T., Meddeb L., Mailhe M., et al. Hydroxychloroquine and azithromycin as a treatment of COVID-19: Results of an open-label non-randomized clinical trial. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2020; 56(1): 105949. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105949>
24. Jiang C., Wang X., Li X., Inlora J., Wang T., Liu Q., et al. Dynamic human environmental exposome revealed by longitudinal personal monitoring. *Cell.* 2018; 175(1): 277–91.e31. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.060>
25. Nicholson J.K., Wilson I.D. Understanding “global” systems biology: metabolomics and the continuum of metabolism. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003; 2(8): 668–76. <https://doi.org/10.1038/nrd1157>
26. Rappaport S.M., Barupal D.K., Wishart D., Vineis P., Scalbert A. The blood exposome and its role in discovering causes of disease. *Environ. Health Perspect.* 2014; 122(8): 769–74. <https://doi.org/10.1289/ehp.1308015>
27. Nicholson J.K., Holmes E., Kinross J.M., Darzi A.W., Takats Z., Lindon J.C. Metabolic phenotyping in clinical and surgical environments. *Nature.* 2012; 491(7424): 384–92. <https://doi.org/10.1038/nature11708>
28. Bray G.A., Redman L.M., de Jonge L., Rood J., Sutton E.F., Smith S.R. Plasma amino acids during 8 weeks of overfeeding: relation to diet body composition and fat cell size in the PROOF study. *Obesity (Silver Spring).* 2018; 26(2): 324–31. <https://doi.org/10.1002/oby.22087>
29. Wild C.P. The exposome: from concept to utility. *Int. J. Epidemiol.* 2012; 41(1): 24–32. <https://doi.org/10.1093/ije/dyr236>

30. Richardson S., Hirsch J.S., Narasimhan M., Crawford J.M., McGinn T., Davidson K.W., et al. Presenting characteristics, comorbidities, and outcomes among 5700 patients hospitalized with COVID-19 in the New York city area. *JAMA*. 2020; 323(20): 2052. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.6775>
31. Su Y., Chen D., Yuan D., Lausted C., Choi J., Dai C.L., et al. Multi-omics resolves a sharp disease-state shift between mild and moderate COVID-19. *Cell*. 2020; 183(6): 1479–95.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.037>
32. Chen Y.M., Zheng Y., Yu Y., Wang Y., Huang Q., Qian F., et al. Blood molecular markers associated with COVID-19 immunopathology and multi-organ damage. *EMBO J*. 2020; e105896. <https://doi.org/10.15252/embj.2020105896>
33. Bankar R., Suvarna K., Ghantasala S. Proteomic investigation reveals dominant alterations of neutrophil degranulation and mRNA translation pathways in COVID-19 patients. *iScience*. 2021; 24(3): 102135. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102135>
34. Shen B., Yi X., Sun Y., Bi X., Du J., Zhang C., et al. Proteomic and metabolomic characterization of COVID-19 patient sera. *Cell*. 2020; 182(1): 59–72.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.032>
35. Suvarna K., Salkar A., Palanivel V., Bankar R., Banerjee N., Gayathri J. et al. A multi-omics longitudinal study reveals alteration of the leukocyte activation pathway in COVID-19 patients. *J. Proteome Res*. 2021. doi: 10.1021/acs.jproteome.1c00215.
36. Züllig T., Zandl-Lang M., Trötz Müller M., Hartler J., Plecko B., Köfeler H.C. A metabolomics workflow for analyzing complex biological samples using a combined method of untargeted and target-list based approaches. *Metabolites*. 2020; 10(9): 1–12. <https://doi.org/10.3390/metabo10090342>
37. Chong J., Wishart D.S., Xia J. Using MetaboAnalyst 4.0 for comprehensive and integrative metabolomics data analysis. *Curr. Protoc. Bioinformatics*. 2019; 68(1): e86. <https://doi.org/10.1002/cpbi.86>
38. Chong J., Xia J. MetaboAnalystR: An R package for flexible and reproducible analysis of metabolomics data. *Bioinformatics*. 2018; 34(24): 4313–4. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty528>
39. Maras J.S., Sharma Sh., Bhat A., Rooge Sh., Aggrawal R., Gupta E., Sarin Sh.K. Multi-omics analysis of respiratory specimen characterizes baseline molecular determinants associated with SARS-CoV-2 outcome. *iScience*. 2021; 24(8): 102823. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102823>
40. Mohammed A., Alghetaa F.K.H., Miranda K., Wilson K., Singh P.N., Cai G., et al. Δ^9 -tetrahydrocannabinol prevents mortality from acute respiratory distress syndrome through the induction of apoptosis in immune cells, leading to cytokine storm suppression. *Int. J. Mol. Sci*. 2020; 21(17): 6244. <https://doi.org/10.3390/ijms21176244>
41. Roberts I., Muelas M.W., Taylor J.M., Davison A.S., Xu Y., Grixti J.M., et al. Untargeted metabolomics of COVID-19 patient serum reveals potential prognostic markers of both severity and outcome. *medRxiv*. 2020; 2020.12.09.20246389. <https://doi.org/10.1101/2020.12.09.20246389>
42. Thomas T., Stefanoni D., Reisz J.A., Nemkov T., Bertolone L., Francis R.O., et al. COVID-19 infection alters kynurenine and fatty acid metabolism, correlating with IL-6 levels and renal status. *JCI Insight*. 2020; 5(14): e140327. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.140327>
43. Fraser D.D., Slessarev M., Martin C.M., Daley M., Patel M.A., Miller M.R., et al. Metabolomics profiling of critically ill coronavirus disease 2019 patients: identification of diagnostic and prognostic biomarkers. *Crit. Care Explor*. 2020; 2(10): e0272. <https://doi.org/10.1097/CCE.0000000000000272>
44. Goto T., Myint K.T., Sato K., Wada O., Kakiyama G., Iida T., et al. LC/ESI-Tandem mass spectrometric determination of bile acid 3-sulfates in human urine 3beta-sulfoxy-12alpha-hydroxy-5beta-cholanoic acid is an abundant nonamidated sulfated. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci*. 2007; 846(1–2): 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.08.013>
45. Carino A., Moraca F., Fiorillo B., Marchianò S., Sepe V., Biagioli M., et al. Hijacking SARS-Cov-2/ACE2 receptor interaction by natural and semi-synthetic steroidal agents acting on functional pockets on receptor binding region. *Pharmacol. Toxicol*. Preprint. 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.06.10.144964>
46. Yan B., Chu H., Yang D., Sze K.H., Lai P.M., Yuan S., et al. Characterization of the lipidomic profile of human coronavirus-infected cells: implications for lipid metabolism remodeling upon coronavirus replication. *Viruses*. 2019; 11(1). <https://doi.org/10.3390/v11010073>
47. Wu D., Shu T., Yang X., Song J.X., Zhang M., Yao C., et al. Plasma metabolomic and lipidomic alterations associated with COVID-19. *Natl. Sci. Rev*. 2020; 7(7): 1157–68. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa086>
48. Arshad H., Alfonso J.C.L., Franke R., Michaelis K., Araujo L., Habib A., et al. Decreased plasma phospholipid concentrations and increased acid sphingomyelinase activity are accurate biomarkers for community-acquired pneumonia. *J. Transl. Med*. 2019; 17(1): 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-2112-z>
49. Barberis E., Timo S., Amede E., Vanella V.V., Puricelli C., Cappellano G., et al. Large-scale plasma analysis revealed new mechanisms and molecules associated with the host response to Sars-Cov-2. *Int. J. Mol. Sci*. 2020; 21(22): 8623. <https://doi.org/10.3390/ijms21228623>
50. Bode C., Berlin M., Röstel F., Teichmann B., Gräler M.H. Evaluating sphingosine and its analogues as potential alternatives for aggressive lymphoma treatment. *Cell. Physiol. Biochem*. 2014; 34(5): 1686–700. <https://doi.org/10.1159/000366370>
51. Merrill A.H., Sandhoff K. Chapter 14 sphingolipids: metabolism and cell signaling. *New Compr. Biochem*. 2002; 36: 373–407. [https://doi.org/10.1016/s0167-7306\(02\)36016-2](https://doi.org/10.1016/s0167-7306(02)36016-2)
52. Bielawski J., Pierce J.S., Snider J., Rembiesa B., Szulc Z.M., Bielawska A. Sphingolipid analysis by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). In: Chalfant C., Poeta M.D., eds. *Sphingolipids as Signaling and Regulatory Molecules. Advances in Experimental Medicine and Biology*. New York, NY: Springer; 2010; 46–59. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6741-1_3
53. Das U.N. Arachidonic acid and other unsaturated fatty acids and some of their metabolites function as endogenous antimicrobial molecules: a review. *J. Adv. Res*. 2018; 11: 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.01.001>
54. Castillo-Peinado L.S., López-Bascón M.A., Mena-Bravo A., Luque de Castro M.D., Priego-Capote F. Determination of primary fatty acid amides in different biological fluids by LC–MS/MS in MRM mode with synthetic deuterated standards: influence of biofluid matrix on sample preparation. *Talanta*. 2019; 193: 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.09.088>
55. Jones D.E., Perez L., Ryan R.O. 3-Methylglutaric acid in energy metabolism. *Clin. Chim. Acta*. 2020; 502: 233–9. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.11.006>
56. Misra B.B. Metabolomics tools to study links between pollution and human health: an exposomics perspective. *Curr. Pollution. Rep*. 2019; 5(3): 93–111. <https://doi.org/10.1007/s40726-019-00109-4>
57. Juarez P.D., Matthews-Juarez P. Applying an exposome-wide (ExWAS) approach to cancer research. *Front. Oncol*. 2018; 8: 313. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00313>
58. Andrianou X.D., Pronk A., Galea K.S., Stierum R., Loh M., Riccardo F., et al. Exposome-based public health interventions for infectious diseases in urban settings. *Environ. Int*. 2021; 146: 106246. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106246>
59. Adeyinka A., Kondamudi N.P. Cholinergic crisis. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020.

60. Kloepfer A., Gnirss R., Jekel M., Reemtsma T. Occurrence of benzothiazoles in municipal wastewater and their fate in biological treatment. *Water Sci. Technol.* 2004; 50(5): 203–8.
61. Eddleston M., Buckley N.A. A strategy for changing plasma pralidoxime kinetics and, perhaps, effect in organophosphorus insecticide poisoning. *Crit. Care Med.* 2011; 39(4): 908–9. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31820a839b>
62. Merrill A.H. Sphingolipid and glycosphingolipid metabolic pathways in the era of sphingolipidomics. *Chem. Rev.* 2011; 111(10): 6387–422. <https://doi.org/10.1021/cr2002917>
63. Mauvais-Jarvis F. Aging, male sex, obesity, and metabolic inflammation create the perfect storm for COVID-19. *Diabetes.* 2020; 69(9): 1857. <https://doi.org/10.2337/dbi19-0023>
64. Adams K., Weber K.S., Johnson S.M. Exposome and immunity training: how pathogen exposure order influences innate immune cell lineage commitment and function. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(22): 8462. <https://doi.org/10.3390/ijms21228462>
65. Maguire G. Better preventing and mitigating the effects of COVID-19. *Future Sci. OA.* 2020; 6(6): FSO586. <https://doi.org/10.2144/foa-2020-0051>
66. Land W.G. Role of damage-associated molecular patterns in light of modern environmental research: a tautological approach. *Int. J. Environ. Res.* 2020; 1–22. <https://doi.org/10.1007/s41742-020-00276-z>

Information about the authors

Shalini Aggarwal — Ph.D., Department of biosciences and bioengineering, Indian Institute of Technology, Mumbai, India, <https://orcid.org/0000-0002-5951-2102>

Shashwati Parihari — Ph.D., Department of biosciences and bioengineering, Indian Institute of Technology, Mumbai, India, <https://orcid.org/0000-0002-3989-019X>

Arghya Banerjee — Ph.D., Department of biosciences and bioengineering, Indian Institute of Technology, Mumbai, India, <https://orcid.org/0000-0002-0043-5827>

Jyotirmoy Roy — student (B. Tech.), Department of chemical engineering, Indian Institute of Technology, Mumbai, India, <https://orcid.org/0000-0002-8124-3121>

Nirjhar Banerjee — Ph.D., Department of biosciences and bioengineering, Indian Institute of Technology, Mumbai, India, <https://orcid.org/0000-0003-3404-9390>

Renuka Bankar — postgraduate student (M. Sci.), junior researcher, Indian Institute of Technology Bombay, Mumbai, India, <https://orcid.org/0000-0001-8530-5062>

Saravanan Kumar — Ph.D. (Life Sci.), team leader — Proteomics, Proteomics Lab, Thermo Fisher Scientific India, Whitefield, Bangalore, India. <https://orcid.org/0000-0001-6352-3595>

Manisha Choudhury — Ph.D., post-doctoral researcher, Department of biosciences and bioengineering, Indian Institute of Technology Bombay, Mumbai, India, <https://orcid.org/0000-0002-6108-9040>

Rhythm Shah — student (B. Tech.), Department of metallurgical engineering and materials science, Indian Institute of Technology Bombay, Mumbai, India, <https://orcid.org/0000-0002-5963-9816>

Kharanshu Bhojak — Student (B. Tech.), Department of metallurgical engineering and materials science, Indian Institute of Technology Bombay, Mumbai, India, <https://orcid.org/0000-0001-8917-2965>

Viswanthram Palanivel — postgraduate student (MSc. biomedical science), junior researcher, Department of biosciences and bioengineering, Indian Institute of Technology Bombay, Mumbai, India, <https://orcid.org/0000-0002-4649-5913>

Akanksha Salkar — postgraduate student (MSc. biological sciences), junior researcher, Department of biosciences and bioengineering, Indian Institute of Technology Bombay, Mumbai, India, <https://orcid.org/0000-0001-9941-0947>

Sachee Agrawal — Assistant Professor, Microbiology, Kasturba Hospital for Infectious Diseases, Chinchpokli, Mumbai, India, SCOPUS ID 56344028500

Om Shrivastav — M.D., Infectious diseases, Kasturba Hospital for Infectious Diseases, Chinchpokli, Mumbai, India, SCOPUS ID 57200535430

Jayanthi Shastri — Professor, Head of Department of microbiology, Kasturba Hospital for Infectious Diseases, Chinchpokli, Mumbai, India, <https://orcid.org/0000-0001-7360-564X>

Sanjeeva Srivastava — Professor, Department of biosciences and bioengineering, Indian Institute of Technology Bombay, Mumbai, India, sanjeeva@iitb.ac.in, <https://orcid.org/0000-0001-5159-6834>

Author contribution. SS, SA, and SP contributed to conceiving the idea, and outline. SA, SP, MC, JR, NB, RS wrote the manuscript. SK, SA, SP, NB, and AB were involved in the optimization of the parameters starting from sample preparation to data analysis pipeline for COVID-19 samples. SA and SP performed the analysis and did literature based analysis. SA performed the pathway and correlation analysis. RB, MC, VP and AS collected and prepared the samples. JR and MC performed exposome analysis. SA, SP, RS and KB prepared the figures. Authors SA, SP, AB, JR; NB and RB; RS and KB are contributed equally. 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 work to be published.

The article was submitted 07.05.2021;
accepted for publication 10.08.2021;
published 30.08.2021

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-89>

Микробный синтез и оценка бактерицидных свойств наночастиц сульфида кадмия

Журавлева О.А.^{1,2}, Воейкова Т.А.^{1,2}, Кулигин В.С.^{1,2}, Дебабов В.Г.^{1,2}

¹Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия;

²Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Москва, Россия

Аннотация

Введение. Продуктивность микробного синтеза стабильных наночастиц определяется стадией роста популяций бактериальных культур, используемых для получения наноструктур. Перспективно изучение биоцидной активности биогенных наночастиц сульфида кадмия (NPsCdS), сравнимых по свойствам с наноматериалами, полученными физико-химическими методами.

Цель работы — оценить влияние фазы роста клеток штаммов бактерий *Bacillus subtilis* 168 и *Shewanella oneidensis* MR-1 на эффективность биосинтеза NPsCdS и изучить их бактерицидные свойства в отношении ряда грамположительных и грамотрицательных штаммов микроорганизмов.

Материалы и методы. Наночастицы получали введением солей Na₂S и CdCl₂ до конечной концентрации 2 мМ : 2 мМ в культуральные жидкости бактерий с клетками, находящимися в различных фазах роста. Эффективность биосинтеза NPsCdS оценивали по оптической плотности водных растворов наночастиц. Бактерицидные свойства NPsCdS определяли по диаметру зоны ингибирования роста грамположительных бактерий *B. subtilis* 168, *B. amyloliquefaciens*, *Streptococcus salivarius*, *Rhodococcus rhodochrous* и грамотрицательных *S. oneidensis* MR-1, *Escherichia coli* K-12, *Pseudomonas putida*.

Результаты. Установлено, что использование клеток в стационарной фазе роста (18–24 ч) способствует получению максимального количества NPsCdS, соответствующего концентрациям 1,0–1,2 мг/мл. Высокая антимикробная активность NPsCdS показана в отношении грамположительных микроорганизмов, среди грамотрицательных бактерий незначительную чувствительность проявил штамм *P. putida*.

Обсуждение. Результаты экспериментов расширяют научные данные о влиянии фазы ростового цикла бактерий для получения наночастиц. В отношении NPsCdS оптимальной является стационарная фаза роста *B. subtilis* 168, *S. oneidensis* MR-1. Впервые продемонстрирована цитотоксичность NPsCdS/*Shewanella* в отношении бактерий различных таксономических групп.

Заключение. Разработан эффективный метод получения внеклеточных NPsCdS с использованием бактерий *B. subtilis* 168, *S. oneidensis* MR-1 в стационарной фазе роста. Показана биоцидная активность биогенных NPsCdS, что позволяет рассматривать их как новый класс противомикробных агентов.

Ключевые слова: микробный синтез, биогенные наночастицы, наночастицы сульфида кадмия, стадия бактериального роста, бактерицидная активность

Благодарность. Выражаем благодарность Национальному биоресурсному центру Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт» — ГосНИИгенетика за предоставление бактериальных штаммов.

Источник финансирования. Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-04-00088.

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

Для цитирования: Журавлева О.А., Воейкова Т.А., Кулигин В.С., Дебабов В.Г. Микробный синтез и оценка бактерицидных свойств наночастиц сульфида кадмия. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(4):416–425.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-89>

Microbial synthesis and evaluation of bactericidal properties of cadmium sulfide nanoparticles

Olga A. Zhuravliova^{1,2}✉, Tatiana A. Voeikova^{1,2}, Vladislav S. Kuligin^{1,2}, Vladimir G. Debabov^{1,2}

¹National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow, Russia;

²State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of the National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow, Russia

Introduction. The productivity of microbial synthesis of stable nanoparticles is determined by the growth stage of the populations of bacterial cultures used to obtain nanostructures. The study of the biocidal activity of biogenic nanoparticles of cadmium sulfide (NPsCdS), comparable in properties with nanomaterials obtained by physico-chemical methods, is promising.

The aim of this work was to evaluate the effect of the cell growth phase of the bacterial strains *Bacillus subtilis* 168 and *Shewanella oneidensis* MR-1 on the efficiency of biosynthesis of NPsCdS and to study their bactericidal properties against a number of gram-positive and gram-negative strains of microorganisms.

Material and methods. Nanoparticles were obtained by introducing Na₂S and CdCl₂ salts to a final concentration of 2 mM : 2 mM in liquid bacterial cultures with cells in different phases of growth. The efficiency of NPsCdS biosynthesis was evaluated by the optical density of aqueous nanoparticles solutions. The bactericidal properties of NPsCdS were determined by the diameter of zone of inhibition growth of gram-positive bacteria *B. subtilis* 168, *B. amyloliquefaciens*, *Streptococcus salivarius*, *Rhodococcus rhodochrous* and gram-negative *S. oneidensis* MR-1, *Escherichia coli* K-12, *Pseudomonas putida*.

Results. It was found that the use of cells in the stationary phase of growth (18–24 hours) contributes to obtaining the maximum amount of NPsCdS corresponding to concentrations of 1.0–1.2 mg/ml. The high antimicrobial activity of NPsCdS was shown against gram-positive microorganisms, among gram-negative bacteria, *P. putida* strain showed insignificant sensitivity.

Discussion. The experimental results expand scientific data about the effect of the phase of bacterial growth cycle on biosynthesis of nanoparticles. The stationary phase of growth of *B. subtilis* 168, *S. oneidensis* MR-1 is optimal for obtaining of NPsCdS. For the first time, the cytotoxicity of NPsCdS/*Shewanella* against bacteria of various taxonomic groups was demonstrated.

Conclusion. An effective method for obtaining extracellular NPsCdS using bacteria *B. subtilis* 168, *S. oneidensis* MR-1 in the stationary phase of growth has been developed. The biocidal activity of biogenic NPsCdS was shown, which allows to consider them as a new class of antimicrobial agents.

Keywords: microbial synthesis, biogenic nanoparticles, nanoparticles of cadmium sulfide, stage of bacterial growth, bactericidal activity

Acknowledgments. We express our gratitude to the Russian National Collection of Industrial Microorganisms of NRC «Kurchatov Institute» — GOSNIIGENETIKA for providing bacterial strains.

Funding source. The reported study was partially funded by RFBR according to the research project № 19-04-00088.

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

For citation: Zhuravliova O.A., Voeikova T.A., Kuligin V.S., Debabov V.G. Microbial synthesis and evaluation of bactericidal properties of cadmium sulfide nanoparticles. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(4):416–425.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-89>

Введение

В последние годы возрос интерес к синтезу флуоресцентных квантовых точек (КТ) полупроводниковых халькогенидов металлов, благодаря их уникальным оптическим, каталитическим и антибактериальным свойствам, обусловленным размером и морфологией [1]. Среди такого типа наноматериалов наиболее значимыми являются наночастицы сульфида кадмия (NPsCdS), обладающие широким спектром поглощения и узкой полосой излучения, длительным временем жизни флуоресценции, высокими показателями фото-

стабильности и квантового выхода [2]. Перечисленные характеристики способствуют применению КТ NPsCdS в производстве оптоэлектронных устройств [3] и фотокатализаторов [4]. Благодаря способности контролировать рост штаммов микроорганизмов, наночастицы металлов и их солей, в том числе NPsCdS, демонстрируют бактерицидную активность против грамположительных (ГП) и грамотрицательных (ГО) бактерий, что делает их перспективными для использования в биомедицине в качестве антибактериальных агентов нового поколения [5, 6].

Для промышленного применения нанокристаллов халькогенидов металлов необходимы коммерчески выгодные и экологически безопасные способы их производства. На сегодняшний день разработаны различные химические и физические методы синтеза NPsCdS, позволяющие контролировать размер и морфологию наноструктур, однако эти промышленные способы имеют, как правило, высокую стоимость, энергетически затратны, требуют использования органических растворителей с образованием избытка токсичных отходов [2].

Биотехнологический подход, основанный на применении природных компонентов — микроорганизмов, водорослей, грибов, дрожжей и растительных экстрактов — в качестве биокатализаторов биосинтеза наночастиц, может служить дополнением и альтернативой промышленному синтезу наночастиц определённого состава [7–9]. Этот метод экономически выгоден, не требует сложной аппаратуры и больших трудозатрат, экологически безопасен. Биосинтез биогенных наночастиц происходит в жидких средах, содержащих соответствующие ионы химических соединений, при оптимальных температурах для биоконпонентов [8]. Различные виды бактерий являются эффективными системами для производства широкого спектра наноструктур, в том числе халькогенидов металлов [8, 9], что позволяет рассматривать микробный синтез наночастиц как новый инструмент «зеленой» химии [9]. Установлено, что локализация процесса биосинтеза наночастиц может быть как внеклеточной, так и внутриклеточной [8], что продемонстрировано в работах [9–11] с использованием других бактериальных штаммов и указывает на разнообразие процессов образования бинарных наночастиц халькогенидов металлов. При этом в большинстве случаев микробный синтез NPsCdS имеет внутриклеточную локализацию, тогда как с практической точки зрения для выделения наночастиц внеклеточный синтез более экономически эффективен и методологически удобен [12]. Поэтому очень важно разрабатывать способы биосинтеза внеклеточных NPsCdS [13].

Многочисленные исследования убедительно доказали, что биомолекулы белков, аминокислот, полисахаридов, секретируемые бактериями, отвечают за образование наноструктур, стабилизацию в водной среде, определяют их размеры и характеристики [7, 8]. Наличие природных биополимеров на поверхности КТ повышает биосовместимость нанокристаллов, что является перспективным для медицинских приложений и выгодно отличает биотехнологический подход от промышленных способов получения наноматериалов [8]. По своим свойствам наночастицы биогенного происхождения сравнимы с нанокристаллами, полученными промышленным способом [9, 14].

Биосинтез наночастиц халькогенидов металлов и их характеристики, такие как форма, размер, тип кристаллической структуры [7], устойчивость к агрегации и заряд поверхности [15], величина запрещенной зоны [16], интенсивность флюоресценции [17], зависят от применяемых видов бактерий и секретируемых ими биомолекул [9]. Условия проведения биосинтеза — время инкубации реакционной смеси [10], концентрация солей металлов [8], температура и показатель pH [12] — влияют на эффективность биосинтеза наноматериалов. Значительную роль в оптимизации процессов получения коллоидных дисперсий биогенных наночастиц играет фаза роста клеток микроорганизмов, применяемых при биосинтезе, что связано с образованием на различных стадиях роста бактерий определённых белков и других биополимерных молекул, адсорбирующихся на поверхности наноструктур и стабилизирующих их в водных суспензиях [9, 12, 16, 18].

В связи с вышеизложенным целью данного исследования была оценка влияния фазы роста клеток бактериальных штаммов *Bacillus subtilis* 168 и *Shewanella oneidensis* MR-1 на эффективность биосинтеза NPsCdS, а также изучение бактерицидных свойств биогенных NPsCdS в отношении штаммов различных таксономических групп.

Материалы и методы

Штаммы микроорганизмов, использованные для проведения биосинтеза наночастиц NPsCdS и оценки их бактерицидных свойств, были получены из Национального биоресурсного центра — Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт» — ГосНИИгенетика.

Среды. Культивирование бактериальных клеток осуществляли на полноценных питательных средах Luria–Bertani в жидкой (LB) и агаризованной (LBA) формах, приготовленных по стандартной прописи [19]. Использовали компоненты питательных сред: агар («Sigma-Aldrich»), триптон, дрожжевой экстракт, натрий хлористый («Диаэм» и «Химмед»). Также в работе применяли соли сульфида натрия — $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$ (ч.д.а) и хлорида кадмия — $\text{CdCl}_2 \times 2,5\text{H}_2\text{O}$ (ч.д.а) («Химмед», «Диаэм»).

Определение фаз роста бактерий *B. subtilis* 168 и *S. oneidensis* MR-1. Штаммы культивировали в 6 мл LB-среды при 30°C в условиях аэрации на круговой качалке при 220 об/мин в течение 18 ч для получения суспензии клеток «ночных» культур. Суспензию клеток «ночной» культуры в объеме 1 мл переносили в колбу, содержащую 100 мл стерильной LB-среды, и определяли оптическую плотность на фотоэлектрическом колориметре «КФК-2МП» («ЗОМЗ») при длине волны 590 нм (OP_{590}). Штаммы культивировали при тех

же условиях в течение 48 ч, отбирая пробы в объеме 2 мл каждые 2–4 ч с последующим измерением ОП₅₉₀, используя в качестве контрольной пробы исходную LB-среду. Построение кривых роста заявленных бактерий выполняли с помощью программы «MS Excel».

Оценка эффективности биосинтеза NPsCdS в зависимости от фазы роста бактерий. Биосинтез NPsCdS проводили с использованием бактериальных культур, находящихся на разных фазах роста. Продолжительность культивирования штаммов на среде LB — 6 ч (начало логарифмической фазы), 8 ч (логарифмическая фаза), 18 и 24 ч (стационарная фаза), 48 ч (фаза отмирания). Эффективность биосинтеза NPsCdS в зависимости от фазы роста бактерии оценивали по ОП₅₉₀ образцов водных растворов наночастиц, полученных по методике бактериального синтеза. В качестве контроля использовали деионизированную воду, измерения проводили трехкратно. Результаты обрабатывали посредством статистических инструментов «MS Excel» для малой выборки. Концентрацию биогенных NPsCdS вычисляли весовым методом [20].

Микробный синтез NPsCdS. Колбы, содержащие по 100 мл LB-среды, засеивали ночными культурами бактерий *B. subtilis* 168 или *S. oneidensis* MR-1, выращенных при 30°C на среде LB, либо суточной культурой бактерий со среды LBA на чашках Петри. Штаммы культивировали при 30°C на круговой качалке (220 об/мин) в течение 6, 8, 18, 24 и 48 ч. В колбы, содержащие культуральную жидкость (КЖ) с клетками бактерий на разных фазах роста, вносили водные растворы солей Na₂S×9H₂O и CdCl₂×2,5H₂O до конечных концентраций 2 мМ : 2 мМ. Вес сухих навесок солей рассчитывали на общий объем КЖ. Инкубацию реакционной смеси клеток *B. subtilis* 168 (или *S. oneidensis* MR-1) и солей осуществляли в течение 24 ч при 30°C и постоянном перемешивании при 220 об/мин. Затем клетки осаждали центрифугированием («MSE») при 8000 об/мин в течение 30 мин и удаляли. Надосадок, содержащий биогенные наночастицы, декантировали и фильтровали через мембранный фильтр «Nuclepore» с размером пор 0,2 мкм («Whatman»). Выделение и очистку NPsCdS из фильтратов осуществляли в стерильной деионизированной воде двукратным центрифугированием («Beckman Coulter») в режиме повышенной скорости 32 000 об/мин — 1 ч. Суспензии диспергированных в деионизированной воде наночастиц хранили при 4°C в микропробирках типа Эппендорф по 1 мл.

Для контрольного эксперимента использовали среду LB того же объема, не содержащую бактериальных клеток, в которую добавляли водные растворы солей Na₂S×9H₂O и CdCl₂×2,5H₂O до конечной концентрации 2 мМ : 2 мМ. Последующие этапы биосинтеза остались без изменения.

Электронная микроскопия. Форму и размер наночастиц NPsCdS, полученных микробным синтезом, а также осадок в контрольном эксперименте анализировали на просвечивающем электронном микроскопе «JEM-2100» («JEOL») с ускоряющим напряжением 200 кэВ в режиме светлопольных изображений [21].

Оценка бактерицидных свойств биогенных NPsCdS. Биоцидные свойства NPsCdS оценивали методом двуслойной диффузии в агаре (LBA) на чашках Петри (диаметр 90 мм) в соответствии с ОФС.1.2.4.0010.18¹. В качестве тест-культур использовали ГО-штаммы (*Shewanella oneidensis* MR-1 № В-9861, *Escherichia coli* К-12 № В-3345, *Pseudomonas putida* № В-4492) и ГП-штаммы микроорганизмов (*Bacillus subtilis* 168 № В-7360, *Bacillus amyloliquefaciens* № В-11265, *Streptococcus salivarius* № В-5994, *Rhodococcus rhodochrous* № В-3043). Антимикробную активность наночастиц контролировали по величине диаметра зоны ингибирования роста тест-штаммов (в мм) в лунках, сделанных в толще агара металлическим штамп-пробойником. В лунки вносили 50 мкл суспензии NPsCdS в концентрации 1 мг/мл, т.е. в лунке содержалось 0,05 мг наночастиц. Время инкубации чашек Петри с тест-микроорганизмами и биогенными NPsCdS составляло 24–48 ч при температурах, оптимальных для жизнедеятельности бактерий. В контрольном эксперименте вместо суспензии наночастиц использовали стерильную деионизированную воду (по 50 мкл на лунку). Эксперименты повторяли трехкратно.

Результаты

Роль бактерий в биосинтезе наночастиц

Роль бактериальных клеток как биологической субстанции в образовании индивидуальных, устойчивых к агломерации наночастиц продемонстрирована в экспериментах по биосинтезу наночастиц в присутствии бактерий. В результате реакции Na₂S и CdCl₂ в жидкой среде образуются NaCl и нерастворимый в воде CdS. При наличии в реакционной среде бактериальных клеток и секретируемых ими белков последние адсорбируются на поверхности частиц CdS, обволакивая их и создавая защитный слой, стабилизирующий наночастицы в водной среде, что предотвращает их агломерацию и седиментацию. В контрольном эксперименте, в результате смешения двух солей, но без участия бактерий, образуется нерастворимый осадок, состоящий из агломерированных частиц CdS. На **рис. 1** представлены фотографии колб со средой LB, в которые были добавлены соли Na₂S и CdCl₂ в отсутствие

¹ Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар ОФС. 1.2.4.0010.18. М., 2018. 32 с.

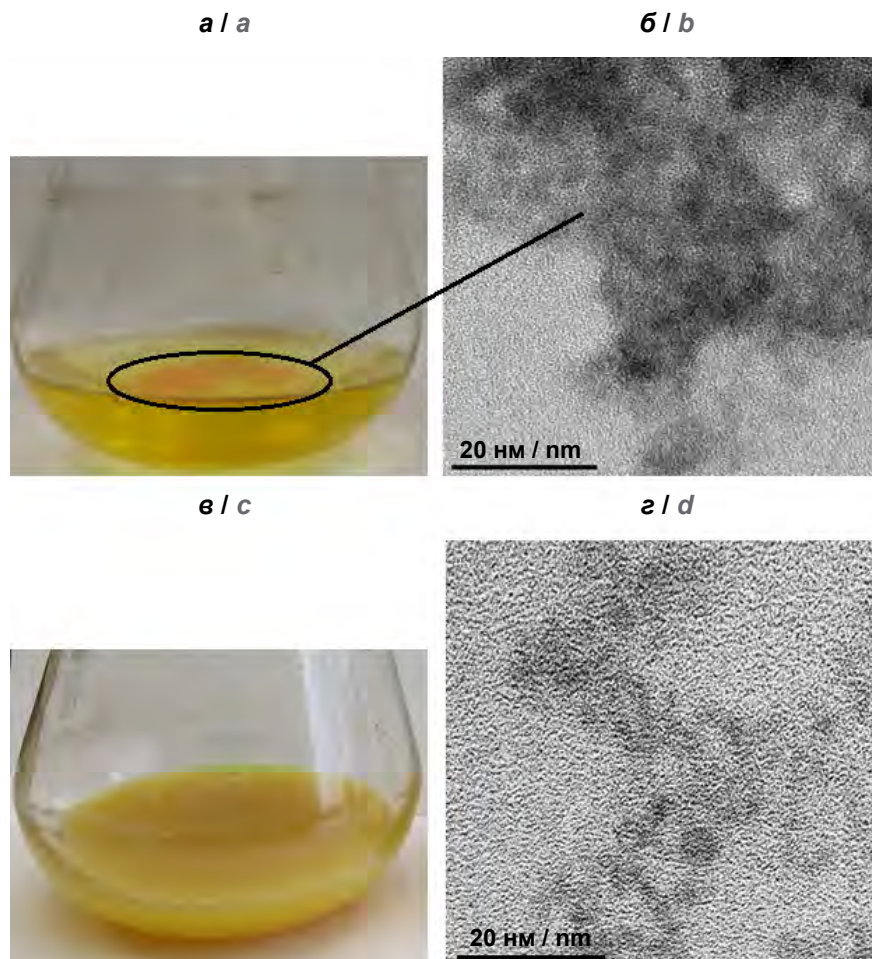


Рис. 1. Синтез CdS в отсутствие и при наличии бактериальных клеток.

a — фрагмент колбы, содержащей соли Na_2S , CdCl_2 в LB-среде (контроль); *b* — электронная микрофотография суспензии частиц, синтезированных в колбе *a*; *c* — фрагмент колбы, содержащей соли Na_2S , CdCl_2 в КЖ *S. oneidensis* MR-1; *d* — микрофотография суспензии NPsCdS из колбы *c*.

Fig. 1. Synthesis of CdS in the absence or presence of bacterial cells.

a — fragment of a flask containing Na_2S , CdCl_2 salts in LB-medium (control); *b* — electron micrograph of a suspension of particles synthesized in the flask *a*; *c* — fragment of a flask containing Na_2S , CdCl_2 salts in culture liquid of *S. oneidensis* MR-1; *d* — micrograph of a suspension of NPsCdS from the flask *c*.

клеток микроорганизмов (рис. 1, *a*), и содержащие клетки штамма *S. oneidensis* MR-1 в стационарной фазе роста (рис. 1, *c*). В первом случае реакционный раствор был практически прозрачным, имел насыщенный жёлтый цвет и плотный оранжевый осадок CdS на дне колбы (рис. 1, *a*), во втором — КЖ в колбе имела желтоватый оттенок, мутность была обусловлена наличием бактериальных клеток и наночастиц в диспергированном состоянии, осадок на дне отсутствовал (рис. 1, *c*).

Полученные суспензии частиц представлены на электронных микрофотографиях. На рис. 1, *b* видно, что частицы, полученные без использования бактериальных клеток, значительно агломерированы и сгруппированы. На микрофотографии образца, синтезированного в КЖ *S. oneidensis* MR-1, различимы расположенные отдельно друг от друга наноразмерные частицы, имеющие кристаллическую

природу, без крупных агломератов (рис. 1, *d*). Таким образом, сравнительный анализ образцов водных суспензий частиц CdS, полученных двумя принципиально различными способами, подтверждает обязательное участие биоконфигураторов, в частности микроорганизмов, в синтезе стабильных в водном растворе биогенных наноструктур.

Фазы роста бактерий B. subtilis 168 и S. oneidensis MR-1, используемых для биосинтеза NPsCdS

Динамика роста бактериальных популяций штаммов *B. subtilis* 168 и *S. oneidensis* MR-1 как периодических культур, выращиваемых на жидкой питательной среде в одинаковых условиях, представлена в виде кривых роста исследуемых микроорганизмов (рис. 2).

Установлено, что оба вида бактерий демонстрируют классический «сценарий» роста и разви-

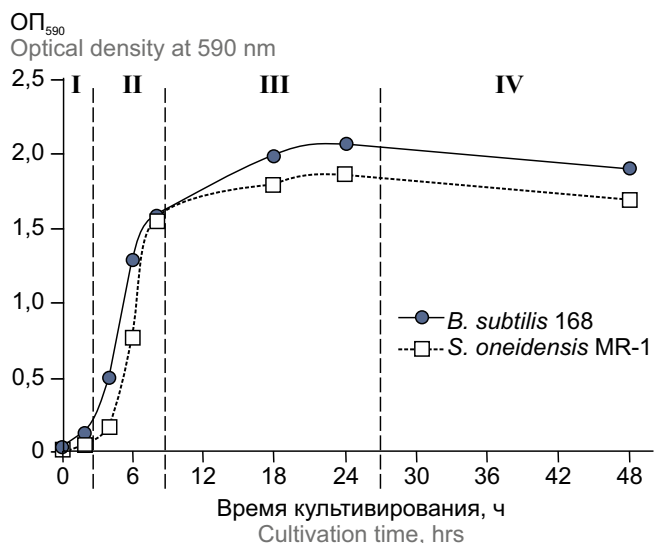


Рис. 2. Динамика бактериального роста *B. subtilis* 168 и *S. oneidensis* MR-1 на жидкой LB-среде при 30°C.

I — лаг-фаза; II — экспоненциальная (лог-фаза);
III — стационарная фаза; IV — фаза отмирания.

Fig. 2. Dynamics of bacterial growth for *B. subtilis* 168 and *S. oneidensis* MR-1 in liquid LB-medium at 30°C.

I — lag-phase; II — exponential (log-phase); III — stationary phase;
IV — phase of cell death.

тия бактериальных популяций при данных условиях культивирования. Так, на рис. 2 отчетливо видна сменяемость фаз роста для обеих культур: I — начальная (лаг-фаза), длящаяся около 2 ч; II — экспоненциальная или логарифмическая (лог-фаза), составляющая примерно 8 ч; далее, начиная с 8 ч, наступает стационарная фаза (III), продолжающаяся до 24–26 ч. По завершении этого времени бактериальные популяции обоих штаммов показывают снижение ОП — микроорганизмы достигают поздней стационарной фазы или фазы отмирания (IV), протекающей вплоть до окончания процесса культивирования. В интервале от лог-фазы и до 48 ч наблюдается незначительное расхождение кривых по величине ОП₅₉₀ — КЖ *B. subtilis* 168 характеризуется большими значениями, чем популяция бактериальных клеток *S. oneidensis* MR-1. Таким образом, культуры *B. subtilis* 168 и *S. oneidensis* MR-1 демонстрируют схожесть ростовых процессов популяций бактериальных клеток.

Эффективность биосинтеза NPsCdS в зависимости от фазы роста бактерий

Определение эффективности биосинтеза NPsCdS в зависимости от фазы роста бактерий было проведено с использованием обоих штаммов. Наночастицы мы обозначили как NPsCdS/*Bacillus* и NPsCdS/*Shewanella*.

Результаты измерений ОП₅₉₀ водных растворов NPsCdS/*Bacillus* и NPsCdS/*Shewanella*, проведенных в соответствии с продолжительностью

культивирования клеток штаммов, приведены на рис. 3. Из гистограммы следует, что вероятность получения большего количества биогенных наночастиц возрастает при использовании бактерий, выращенных в интервале 18–24 ч, т.е. на стационарной стадии культивирования клеток в питательной среде. При этом максимальное значение ОП₅₉₀ коллоидного раствора наночастиц было достигнуто при использовании 24-часовой культуры, что позволяет говорить о стационарной фазе ростового цикла как об оптимальной для биосинтеза нанокристаллов. Полученное значение ОП₅₉₀ NPsCdS/*Bacillus* соответствовало $1,2 \pm 0,1$ мг/мл, а NPsCdS/*Shewanella* — $1,0 \pm 0,1$ мг/мл концентрации биогенных наночастиц в водном растворе.

Проведение реакции биосинтеза NPsCdS с использованием клеток штаммов в лог-фазе (6–8 ч) или на стадии отмирания (48 ч) приводит к значительному снижению ОП₅₉₀ коллоидного раствора наночастиц и, как следствие, к снижению концентрации биогенных наночастиц в конечном водном растворе по сравнению с использованием 24-часовых культур.

Антимикробная активность биогенных NPsCdS

В соответствии с целями работы были определены биоцидные свойства наночастиц NPsCdS биогенного происхождения. Для лабораторных испытаний использовали водную суспензию NPsCdS/*Shewanella*. Результаты сравнительного анализа зон подавления роста тест-культур (таблица) демонстрируют явное различие в чувствительности микроорганизмов к воздействию биогенных наночастиц. Из таблицы видно, что из 4 исследованных ГП-штаммов различных видов все представители

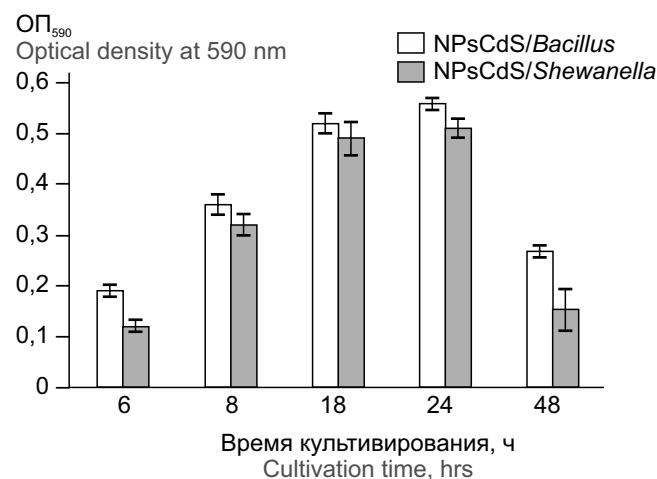


Рис. 3. Зависимость эффективности биосинтеза NPsCdS от времени культивирования бактерий *B. subtilis* 168 и *S. oneidensis* MR-1.

Fig. 3. Dependence of the efficiency of biosynthesis of NPsCdS on the cultivation time of bacteria *B. subtilis* 168 and *S. oneidensis* MR-1.

Антимикробная активность NPsCdS/*Shewanella* в отношении тест-культур микроорганизмов различных таксономических групп ($M \pm m$)

Antimicrobial activity of NPsCdS/*Shewanella* against test cultures of microorganisms of various taxonomic groups ($M \pm m$)

Штаммы Strains	Зона ингибирования, диаметр, мм Zone of inhibition, mm in diameter	
	NPsCdS	контроль control
ГП-штаммы / Gram-positive strains		
<i>B. subtilis</i> 168 № B-7360	26,0 ± 1,0	0
<i>B. amyloliquefaciens</i> № B-11265	22,0 ± 1,0	0
<i>S. salivarius</i> № B-5994	22,0 ± 1,0	0
<i>R. rhodochrous</i> № B-3043	18,0 ± 1,0	0
ГО-штаммы / Gram-negative strains		
<i>S. oneidensis</i> MR-1 № B-9861	0	0
<i>E. coli</i> K-12 № B-3345	0	0
<i>P. putida</i> № B-4492	12,0 ± 1,0	0

Примечание. Эксперимент проведён в 3 независимых повторках.
Note. Experiment was carried out in 3 independent repetitions.

оказались чувствительными к действию наночастиц, тогда как среди 3 ГО-штаммов только один демонстрировал чувствительность, выражающуюся небольшим диаметром зоны подавления роста штамма наночастицами. Таким образом, ГП-штаммы более чувствительны к NPsCdS по сравнению с бактериями, принадлежащими к ГО-группе. Среди ГП-штаммов также наблюдается различие по уровню чувствительности к биогенным наночастицам. Так, из 4 видов ГП-бактерий наиболее чувствительным оказался штамм *B. subtilis* 168. Бактерии *B. amyloliquefaciens*, *S. salivarius* и *R. rhodochrous* проявляли меньшую чувствительность к действию NPsCdS. ГО-бактерии *S. oneidensis* MR-1 и *E. coli* K-12 были устойчивы к NPsCdS. Наночастицы NPsCdS/*Shewanella* подавляли рост тест-культуры *P. putida*, однако при сравнении величины зоны ингибирования этого штамма с ГП-бактериями такой результат можно считать незначительным. В случае с контрольными образцами, содержащими стерильную деионизированную воду вместо наночастиц, подавления роста микроорганизмов не наблюдали (таблица).

Обсуждение

В подтверждение основополагающей роли биомолекул бактериального происхождения в формировании и стабилизации биогенных наноструктур нами ранее был проведен ряд исследований по

изучению условий микробного синтеза наночастиц сульфидов металлов, в частности NPsCdS, количественной и качественной оценке состава биослоя, адсорбированного на поверхности наночастиц, определению их параметров [13]. Так, при использовании разработанной нами оптимизированной методики биосинтеза наночастиц — путём введения реакционных солей-источников ионов серы и металла в КЖ бактерий — был подтверждён внеклеточный механизм синтеза наноструктур сульфидов серебра, кадмия и цинка на поверхности бактериальных клеток штаммов различных видов или в непосредственной близости с ними в зоне внеклеточной полимерной субстанции [20, 21], что для практического получения биогенных наноструктур наиболее эффективно.

Установлено влияние бактерии на формирование определённого состава биослоя на поверхности NPsCdS и других наночастиц сульфидов металлов: для *S. oneidensis* MR-1 характерна адсорбция до 15 разнообразных белковых молекул внешней оболочки или цитоплазматической мембраны бактерии, тогда как для *B. subtilis* 168 — всего один вид белка — флагеллин [21]. Белок-покрытые наночастицы характеризовались устойчивостью к агрегации в водном растворе, связанной с величиной показателя дзета-потенциала (–22,4 мВ для NPsCdS/*Shewanella* и –20,5 мВ для NPsCdS/*Bacillus*) и гидродинамического диаметра (160 и 250 нм соответственно) [22]. По нашим данным, биогенные NPsCdS вне зависимости от штамма бактерии характеризуются как сферические нанокристаллы диаметром 5 ± 1 нм, флуоресцирующие в синей области спектра (300–400 нм) при длине волны возбуждения 270 нм [22].

В настоящей работе гистограмма зависимости эффективности получения NPsCdS от времени культивирования *B. subtilis* и *S. oneidensis* (рис. 3) демонстрирует продуктивность стационарной фазы роста обеих бактерий, что соотносится с данными литературы. Действительно, в исследовании [18] инкубация смеси CdCl₂ и Na₂S с клетками *E. coli*, выращенными на стационарной фазе, привела к почти 20-кратному повышению продуктивности монодисперсных КТ NPsCdS (2–5 нм) по сравнению с граничащей поздней лог-фазой. Авторы объяснили это увеличением выхода большого количества восстановленных тиолов, доступных на протяжении стационарной стадии роста *E. coli*. В эксперименте [16] добавление CdCl₂ к клеткам *E. coli*, находящимся ближе к концу лог-стадии, способствовало внеклеточному синтезу NPsCdS, тогда как введение соли на ранней стадии клеточного роста привело к внутриклеточному осаждению наночастиц, затрудняющему их извлечение и очистку.

В нашей работе продуктивность стационарной стадии роста *B. subtilis* и *S. oneidensis* доказана повышением выхода NPsCdS на 20–25% по сравнению

с лог-фазой (8 ч) и на 45–50% по сравнению с 48-часовыми культурами (рис. 3). Данные соотносятся с ростовыми кривыми культур, также имеющими максимумы ОП₅₉₀ КЖ в стационарной фазе (рис. 2). Видимо, это связано с наибольшей концентрацией клеток в данной фазе роста, а также с активной жизнедеятельностью бактерий в питательной среде, способных выделять молекулы белка и других метаболитов в количестве, необходимом для генерации наноструктур, их накопления и стабилизации. Снижение биосинтеза NPsCdS (ОП₅₉₀) при использовании бактерий, культивируемых в течение 6, 8 или 48 ч, можно интерпретировать недостаточным для образования наночастиц количеством секретируемых белков. Негативное влияние на эффективность синтеза NPsCdS может быть следствием разрушения клеток из-за сокращения питательных веществ, накопления продуктов жизнедеятельности или под воздействием ферментов в условиях длительного культивирования бактерий (48 ч).

Возможность регулирования процесса получения наночастиц, покрытых слоем стабилизатора природного происхождения, привлекательна для внедрения биогенных наноструктур в конкретные приложения биомедицины. Так, мощное антибактериальное и противораковое действие NPsCdS, полученных физико-химическими методами [5, 6], подтолкнуло исследователей к изучению антимикробной активности биогенных наночастиц. Тестирование NPsCdS, синтезированных в присутствии клеток *E. coli*, показало подавление роста штаммов пищевых патогенных бактерий *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus licheniformis*, *E. coli* и гриба *Aspergillus flavus*, а также высокую цитотоксичность для раковых клеток меланомы *Mus musculus* (B16F10) и эпидермоидной карциномы человека (A431) по сравнению с 5-аминолевулиновой кислотой как стандартным противораковым препаратом [11]. NPsCdS/*E. coli* E-30 и NPsCdS/*Klebsiella* sp. K-6 были активнее, чем химически синтезированные наночастицы, в отношении бактерий *Staphylococcus aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, а также грибов *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Geotrichum candidum*. Причем ГП-штаммы были более чувствительными, чем ГО-штаммы [14]. Нами были получены схожие результаты при использовании для биосинтеза NPsCdS других штаммов, в частности *S. oneidensis* MR-1: ГП-тест-культуры оказались менее устойчивыми к действию NPsCdS/*Shewanella*, чем ГО-штаммы (таблица).

Такая разница в восприимчивости микроорганизмов, скорее всего, связана с природой строения их клеточной стенки, определяющей проницаемость бактерий [23]. Известно, что клеточные стенки ГП-бактерий содержат многослойный пептидогликан, ковалентно связанный с отрицательно заряженными цепями тейхоевой кислоты. Белки

с отрицательным зарядом поверхности, вступая в электростатическое взаимодействие с положительными ионами Cd²⁺-наночастиц, облегчают проникновение последних через мембрану клеток и их дальнейшее разрушение [23]. В исследовании [24] ингибирующее действие NPsCdS на ГП-штаммы объясняют контактом Cd²⁺ с тиоловыми группами дыхательных ферментов бактерий, что приводит к производству активных форм кислорода и, как следствие, деструкции клеток.

Отсутствие или незначительная восприимчивость ГО-тест-штаммов к NPsCdS/*Shewanella* также сводится к особенности строения их клеточной стенки. ГО-бактерии имеют во внешней мембране липополисахариды, липидная часть которых действует как эндотоксин, препятствующий проникновению чужеродных макромолекул из окружающей клетку среды [23]. При этом небольшое подавление роста *P. putida* (таблица) можно объяснить малым размером ингибирующих наночастиц (5 ± 1 нм), поскольку с уменьшением размера нанобъекта увеличивается площадь поверхности взаимодействия с бактериальной клеткой [11].

Таким образом, доказана антибактериальная активность NPsCdS, полученных методологически простым и экологически безопасным внеклеточным синтезом.

Заключение

Разработан эффективный метод получения внеклеточных NPsCdS с использованием бактерий *B. subtilis* 168, *S. oneidensis* MR-1. Установлено, что наиболее продуктивной фазой для биосинтеза наночастиц является стационарная фаза роста исследуемых штаммов. Показана биоцидная активность NPsCdS, что позволяет рассматривать их в качестве нового класса противомикробных препаратов и терапевтических агентов в борьбе с мультирезистентными бактериями, что удовлетворяет современным тенденциям биомедицины.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Veerathangam K., Pandian M.S., Ramasamy P. Size-dependent photovoltaic performance of cadmium sulfide (CdS) quantum dots for solar cell applications. *J. Alloys Compd.* 2018; 735: 202–8. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2017.11.055>
2. Садовников С.И., Гусев А.И., Ремпель А.А., ред. *Полупроводниковые наноструктуры сульфидов свинца, кадмия и серебра*. М.: Физматлит; 2018.
3. Moghaddam M., Naderi N., Hosseinifard M., Kazemzadeh A. Improved optical and structural properties of cadmium sulfide nanostructures for optoelectronic applications. *Ceram. Int.* 2020; 46(6): 7388–95. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.11.234>
4. Cheng L., Xiang Q., Liao Y., Zhang H. CdS-based photocatalysts. *Energy Environ. Sci.* 2018; 11: 1362–91. <https://doi.org/10.1039/C7EE03640J>
5. Nivetha A., Mangala D., Prabha S.I. Fascinating physico-chemical properties and resourceful applications of selected cadmium

- nanomaterials. *J. Inorg. Organomet. Polym.* 2019; 29: 1423–38. <https://doi.org/10.1007/s10904-019-01141-z>
6. Mostafa A.M., Mwafy E.A., Hasanin M.S. One-pot synthesis of nanostructured CdS, CuS, and SnS by pulsed laser ablation in liquid environment and their antimicrobial activity. *Opt. Laser Technol.* 2020; 121: 105824. <https://doi.org/10.1016/j.optlastec.2019.105824>
 7. Ullah M.W., Shi Z., Shi X., Zeng D., Li S., Yang G. Microbes as structural templates in biofabrication: study of surface chemistry and applications. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2017; 5(12): 11163–75. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b02765>
 8. Gahlawat G., Choudhury A.R. A review on the biosynthesis of metal and metal salt nanoparticles by microbes. *RSC Adv.* 2019; 9: 12944–67. <https://doi.org/10.1039/C8RA10483B>
 9. Feng Y., Marusak K.E., You L., Zauscher S. Biosynthetic transition metal chalcogenide semiconductor nanoparticles: progress in synthesis, property control and applications. *Current Opinion in Colloid and Interface Science.* 2018; 38: 190–203. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2018.11.002>
 10. Yang Z., Lu L., Berard V.F., He Q., Kiely C.J., Berger B.W., et al. Biomufacturing of CdS quantum dots. *Green Chem.* 2015; 17: 3775–82. <https://doi.org/10.1039/C5GC00194C>
 11. Shivashankarappa A., Sanjay K.R. *Escherichia coli*-based synthesis of cadmium sulfide nanoparticles, characterization, antimicrobial and cytotoxicity studies. *Braz. J. Microbiol.* 2020; 51(3): 939–48. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00238-9>
 12. Kumar A., Singh A.K., Choudhary K.K., eds. *Role of Plant Growth Promoting Microorganisms in Sustainable Agriculture and Nanotechnology.* Elsevier Inc.; 2019.
 13. Журавлева О.А., Воейкова Т.А., Хаддаж М.Х., Булушова Н.В., Исмагулова Т.Т., Бахтина А.В. и др. Бактериальный синтез наночастиц сульфидов кадмия и цинка. Характеристика и перспектива их применения. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2018; 36(4): 191–8. <https://doi.org/10.17116/molgen201836041191>
 14. Elsalam Abd S.S., Taha R.H., Tawfeik A.M., El-Monem Abd M.O., Mahmoud H.A. Antimicrobial activity of bio and chemical synthesized cadmium sulfide nanoparticles. *Egypt. J. Hosp. Med.* 2018; 70(9): 1494–507. <https://doi.org/10.12816/0044675>
 15. Sankhla A., Sharma R., Yadav R.S., Kashyap D., Kothari S.L., Kachhwaha S. Biosynthesis and characterization of cadmium sulfide nanoparticles — an emphasis of zeta potential behavior due to capping. *Mater. Chem. Phys.* 2016; 170: 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2015.12.017>
 16. Marusak K.E., Feng Y., Eben C.F., Payne S.T., Cao Y., You L., et al. Cadmium sulphide quantum dots with tunable electronic properties by bacterial precipitation. *RSC Adv.* 2016; 6(80): 76158–66. <https://doi.org/10.1039/C6RA13835G>
 17. Qi P., Zhang D., Zeng Y., Wan Y. Biosynthesis of CdS nanoparticles: A fluorescent sensor for sulfate-reducing bacteria detection. *Talanta.* 2016; 147: 142–6. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.09.046>
 18. Sweeney R.Y., Mao C., Gao X., Burt J.L., Belcher A.M., Georgiou G., et al. Bacterial biosynthesis of cadmium sulfide nanocrystals. *Chem. Biol.* 2004; 11(11): 1553–9. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2004.08.022>
 19. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д., ред. *Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.* М.: Мир; 1984.
 20. Воейкова Т.А., Журавлева О.А., Грачева Т.С., Булушова Н.В., Исмагулова Т.Т., Шайтан К.В. и др. Оптимизация микробного синтеза наночастиц сульфида серебра. *Биотехнология.* 2017; 33(3): 38–46. <https://doi.org/10.1016/10.21519/0234-2758-2017-33-3-38-46>
 21. Воейкова Т.А., Шебанова А.С., Иванов Ю.Д., Кайшева А.Л., Новикова Л.М., Журавлева О.А. и др. Роль белков внешней мембраны бактерии *Shewanella oneidensis* MR-1 в образовании и стабилизации наночастиц сульфида серебра. *Биотехнология.* 2015; 31(5): 41–8.
 22. Воейкова Т.А., Журавлева О.А., Кулигин В.С., Иванов Е.В., Кожухова Е.И., Егоров А.С. и др. Природоподобный метод получения полимерных нанокомпозитов и изучение их физико-химических свойств. *Вопросы материаловедения.* 2019; (4): 113–23. <https://doi.org/10.22349/1994-6716-2019-100-4-113-123>
 23. Alsaggaf M.S., Elbaz A.F., Badawy El S., Moussa S.H. Anticancer and antibacterial activity of cadmium sulfide nanoparticles by *Aspergillus niger*. *Adv. Polym. Technol.* 2020; 2020: 4909054. <https://doi.org/10.1155/2020/4909054>
 24. Bhat Ul I.H., Yi Y.S. Green synthesis and antibacterial activity of cadmium sulfide nanoparticles (CdSNPs) using *Panicum sarmentosum*. *Asian J. Green Chem.* 2019; 3(4): 455–69. <https://doi.org/10.33945/SAMI/AJGC.2019.4.3>

REFERENCES

1. Veerathangam K., Pandian M.S., Ramasamy P. Size-dependent photovoltaic performance of cadmium sulfide (CdS) quantum dots for solar cell applications. *J. Alloys Compd.* 2018; 735: 202–8. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2017.11.055>
2. Sadovnikov S.I., Gusev A.I., Rempel A.A., eds. *Semiconductor Nanostructures of Lead, Cadmium and Silver Sulfides [Poluprovodnikovye nanostruktury sulfidov svintsya, kadmiya i serebra]*. Moscow: Fizmatlit; 2018. (in Russian)
3. Moghaddam M., Naderi N., Hosseinifard M., Kazemzadeh A. Improved optical and structural properties of cadmium sulfide nanostructures for optoelectronic applications. *Ceram. Int.* 2020; 46(6): 7388–95. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.11.234>
4. Cheng L., Xiang Q., Liao Y., Zhang H. CdS-Based photocatalysts. *Energy Environ. Sci.* 2018; 11: 1362–91. <https://doi.org/10.1039/C7EE03640J>
5. Nivetha A., Mangala D., Prabha S.I. Fascinating physico-chemical properties and resourceful applications of selected cadmium nanomaterials. *J. Inorg. Organomet. Polym.* 2019; 29: 1423–38. <https://doi.org/10.1007/s10904-019-01141-z>
6. Mostafa A.M., Mwafy E.A., Hasanin M.S. One-pot synthesis of nanostructured CdS, CuS, and SnS by pulsed laser ablation in liquid environment and their antimicrobial activity. *Opt. Laser Technol.* 2020; 121: 105824. <https://doi.org/10.1016/j.optlastec.2019.105824>
7. Ullah M.W., Shi Z., Shi X., Zeng D., Li S., Yang G. Microbes as structural templates in biofabrication: study of surface chemistry and applications. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2017; 5(12): 11163–75. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b02765>
8. Gahlawat G., Choudhury A.R. A review on the biosynthesis of metal and metal salt nanoparticles by microbes. *RSC Adv.* 2019; 9: 12944–67. <https://doi.org/10.1039/C8RA10483B>
9. Feng Y., Marusak K.E., You L., Zauscher S. Biosynthetic transition metal chalcogenide semiconductor nanoparticles: progress in synthesis, property control and applications. *Current Opinion in Colloid and Interface Science.* 2018; 38: 190–203. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2018.11.002>
10. Yang Z., Lu L., Berard V.F., He Q., Kiely C.J., Berger B.W., et al. Biomufacturing of CdS quantum dots. *Green Chem.* 2015; 17: 3775–82. <https://doi.org/10.1039/C5GC00194C>
11. Shivashankarappa A., Sanjay K.R. *Escherichia coli*-based synthesis of cadmium sulfide nanoparticles, characterization, antimicrobial and cytotoxicity studies. *Braz. J. Microbiol.* 2020; 51(3): 939–48. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00238-9>

12. Kumar A., Singh A.K., Choudhary K.K., eds. *Role of Plant Growth Promoting Microorganisms in Sustainable Agriculture and Nanotechnology*. Elsevier Inc.; 2019.
13. Zhuravleva O.A., Voeykova T.A., Khaddazh M.Kh., Bulushova N.V., Ismagulova T.T., Bakhtina A.V., et al. Bacterial synthesis of cadmium and zinc sulfide nanoparticles: characteristics and prospects of application. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2018; 36(4): 233–40. <https://doi.org/10.17116/molgen201836041191>
14. Elsalam Abd S.S., Taha R.H., Tawfeik A.M., El-Monem Abd M.O., Mahmoud H.A. Antimicrobial activity of bio and chemical synthesized cadmium sulfide nanoparticles. *Egypt. J. Hosp. Med.* 2018; 70(9): 1494–507. <https://doi.org/10.12816/0044675>
15. Sankhla A., Sharma R., Yadav R.S., Kashyap D., Kothari S.L., Kachhwaha S. Biosynthesis and characterization of cadmium sulfide nanoparticles — an emphasis of zeta potential behavior due to capping. *Mater. Chem. Phys.* 2016; 170: 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2015.12.017>
16. Marusak K.E., Feng Y., Eben C.F., Payne S.T., Cao Y., You L., et al. Cadmium sulphide quantum dots with tunable electronic properties by bacterial precipitation. *RSC Adv.* 2016; 6(80): 76158–66. <https://doi.org/10.1039/C6RA13835G>
17. Qi P., Zhang D., Zeng Y., Wan Y. Biosynthesis of CdS nanoparticles: A fluorescent sensor for sulfate-reducing bacteria detection. *Talanta*. 2016; 147: 142–6. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.09.046>
18. Sweeney R.Y., Mao C., Gao X., Burt J.L., Belcher A.M., Georgiou G., et al. Bacterial biosynthesis of cadmium sulfide nano-crystals. *Chem. Biol.* 2004; 11(11): 1553–9. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2004.08.022>
19. Maniatis T., Fritsch E.E., Sambrook J. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor lab.; 1982.
20. Voeykova T.A., Zhuravleva O.A., Gracheva T.S., Bulushova N.V., Ismagulova T.T., Shaytan K.V., et al. Optimization of microbial synthesis of silver sulfide nanoparticles. *Biotekhnologiya*. 2017; 33(3): 38–46. <https://doi.org/10.1016/10.21519/0234-2758-2017-33-3-38-46> (in Russian)
21. Voeykova T.A., Shebanova A.S., Ivanov Yu.D., Kaysheva A.L., Novikova L.M., Zhuravleva O.A., et al. The role of proteins of the outer membrane of *Shewanella oneidensis* MR-1 in the formation and stabilization of silver sulfide nanoparticles. *Biotekhnologiya*. 2015; 31(5): 769–75. <https://doi.org/10.1134/S0003683816080081>
22. Voeykova T.A., Zhuravleva O.A., Kuligin V.S., Ivanov E.V., Kozhukhova E.I., Egorov A.S., et al. Production of polymeric nanocomposites by nature-like method and study of their physical and chemical properties. *Voprosy materialovedeniya*. 2019; (4): 113–23. <https://doi.org/10.22349/1994-6716-2019-100-4-113-123> (in Russian)
23. Alsaggaf M.S., Elbaz A.F., Badawy El S., Moussa S.H. Anticancer and antibacterial activity of cadmium sulfide nanoparticles by *Aspergillus niger*. *Adv. Polym. Technol.* 2020; 2020: 4909054. <https://doi.org/10.1155/2020/4909054>
24. Bhat Ul I.H., Yi Y.S. Green synthesis and antibacterial activity of cadmium sulfide nanoparticles (CdSNPs) using *Panicum sarmentosum*. *Asian J. Green Chem.* 2019; 3(4): 455–69. <https://doi.org/10.33945/SAMI/AJGC.2019.4.3>

Информация об авторах

Журавлева Ольга Алексеевна — к.х.н., м.н.с. лаб. белковой инженерии группы нанобиотехнологий НИЦ «Курчатовский институт» и НИЦ «Курчатовский институт» — ГосНИИГенетика, Москва, Россия, zhuravlevaolgga@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8751-8184>

Воейкова Татьяна Александровна — к.б.н., в.н.с., с.н.с. лаб. белковой инженерии группы нанобиотехнологий НИЦ «Курчатовский институт» и НИЦ «Курчатовский институт» — ГосНИИГенетика, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8864-9266>

Кулигин Владислав Сергеевич — инженер-исследователь лаб. белковой инженерии группы нанобиотехнологий НИЦ «Курчатовский институт»; аспирант НИЦ «Курчатовский институт» — ГосНИИГенетика, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4674-4577>

Дебабов Владимир Георгиевич — д.б.н., акад. РАН, проф., зав. лаб. белковой инженерии, научный руководитель Курчатовского комплекса генетических исследований НИЦ «Курчатовский институт» и НИЦ «Курчатовский институт» — ГосНИИГенетика, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8441-1100>

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 17.09.2020;
принята к публикации 10.02.2021;
опубликована 20.05.2021

Information about the authors

Olga A. Zhuravliova — Cand. Sci. (Chem.), junior researcher, Laboratory of protein engineering, Nanobiotechnology group, NRC «Kurchatov Institute» and NRC «Kurchatov Institute» — GOSNIIGENETIKA, Moscow, Russia, zhuravlevaolgga@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8751-8184>

Tatiana A. Voeykova — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, senior researcher, Laboratory of protein engineering, Nanobiotechnology group, NRC «Kurchatov Institute» and NRC «Kurchatov Institute» — GOSNIIGENETIKA, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8864-9266>

Vladislav S. Kuligin — research engineer, Laboratory of protein engineering, Nanobiotechnology group, NRC «Kurchatov Institute», post-graduate student, NRC «Kurchatov Institute» — GOSNIIGENETIKA, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4674-4577>

Vladimir G. Debabov — D. Sci. (Biol.), Full Member of RAS, Professor, Head, Laboratory of protein engineering, Scientific Director, Nanobiotechnology group, NRC «Kurchatov Institute» and NRC «Kurchatov Institute» — GOSNIIGENETIKA, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8441-1100>

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 17.09.2020;
accepted for publication 10.02.2021;
published 20.05.2021

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-101>

Формирование *in vitro* устойчивости к колистину у карбапенеморезистентных грамотрицательных бактерий и её биологическая стоимость

Тапальский Д.В.^{1✉}, Петровская Т.А.¹, Козлов А.Е.^{1,2}¹Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь;²Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси, Гомель, Беларусь

Аннотация

Введение. Распространение устойчивости к карбапенемам среди грамотрицательных бактерий привело к росту потребления полимиксинов и появлению отдельных устойчивых к ним штаммов. Устойчивость к полимиксинам связана главным образом с мутациями в хромосомных генах. Развитие мутационной устойчивости к антибиотикам может приводить к снижению жизнеспособности бактерий, что проявляется увеличением продолжительности клеточного цикла, снижением вирулентности и конкурентоспособности.

Цель исследования — оценить *in vitro* интенсивность формирования устойчивости к колистину у карбапенеморезистентных клинических изолятов грамотрицательных бактерий, стабильность сформированной резистентности и её биологическую стоимость.

Материалы и методы. Для 46 штаммов *Klebsiella pneumoniae*, 77 штаммов *Pseudomonas aeruginosa* и 42 штаммов *Acinetobacter baumannii* методом полимеразной цепной реакции в реальном времени выполнена детекция генов карбапенемаз, методом микроразведений в бульоне определены минимальные подавляющие концентрации меропенема и колистина. Выполнена селекция устойчивых субпопуляций на агаре Мюллер–Хинтон с добавлением 16 мг/л колистина. Для колистинорезистентных мутантов и изогенных чувствительных штаммов определены кинетические параметры роста в бульонной культуре. Инкубация и учёт результатов выполнены на микропланшетном ридере «Infinite M200» в течение 18,5 ч при 35°C с измерением светорассеяния в лунках каждые 15 мин.

Результаты. Выявлена продукция карбапенемаз МБЛ VIM у штаммов *P. aeruginosa*, МБЛ NDM, KPC и OXA-48 — у *K. pneumoniae*, OXA-23 и OXA-40 — у *A. baumannii*. Все штаммы были чувствительны к колистину (минимальная подавляющая концентрация 0,062–2 мг/л). Рост колоний на селективной среде, содержащей 16 мг/л колистина, отмечен для 97,8% штаммов *K. pneumoniae*, 16,9% штаммов *P. aeruginosa* и 61,9% штаммов *A. baumannii*. Мутационная природа устойчивости к колистину подтверждена для 21,7% штаммов *K. pneumoniae*. Для колистинорезистентных мутантов *K. pneumoniae* отмечено значимое увеличение продолжительности лаг-периода (T_{lag}): $225,6 \pm 7,037$ мин у исходных чувствительных штаммов и $245,5 \pm 8,726$ у резистентных мутантов; $p = 0,037$. Показатели времени удвоения количества микробных клеток в экспоненциальной фазе роста ($T_{doubling}$) и площади под кривой бактериального роста не имели значимых отличий.

Заключение. Выявлена высокая частота формирования *in vitro* устойчивости к колистину у карбапенемозопродуцирующих штаммов *K. pneumoniae*. Отсутствие значительных изменений кинетики микробного роста у резистентных штаммов позволяет прогнозировать дальнейшее распространение мутационной резистентности к колистину, а также её сохранение в микробных популяциях *K. pneumoniae* даже в случае ограничения использования этого антибиотика.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, колистин, карбапенемы, карбапенемазы, мутации, резистентность, биологическая стоимость

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках государственного задания по теме НИР № ГР 20200311 «Изучение биологических и молекулярно-генетических механизмов формирования устойчивости к полимиксинам у экстремально-антибиотикорезистентных грамотрицательных бактерий и обоснование комбинированной антибиотикотерапии вызываемых ими инфекций».

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

Для цитирования: Тапальский Д.В., Петровская Т.А., Козлов А.Е. Формирование *in vitro* устойчивости к колистину у карбапенеморезистентных грамотрицательных бактерий и её биологическая стоимость. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(4):426–433.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-101>

Formation *in vitro* of colistin resistance in carbapenem-resistant Gram-negative bacteria and its biological cost

Dmitry V. Tapalski[✉], Tatiana A. Petrovskaya¹, Aleksandr E. Kozlov^{1,2}

¹Gomel State Medical University, Gomel, Belarus;

²Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Belarus

Abstract

Introduction. The spread of resistance to carbapenems among gram-negative bacteria have led to an increase in the consumption of polymyxins and the emergence of certain strains resistant to them. Polymyxin resistance is mainly associated with mutations in chromosomal genes. The development of mutational resistance to antibiotics can lead to a decrease in the viability of bacteria, which is manifested by an increase in the duration of the cell cycle, a decrease in virulence and competitive fitness.

The purpose of the study was to assess *in vitro* the intensity of the formation of colistin resistance in carbapenem-resistant clinical isolates of gram-negative bacteria, the stability of the formed emerged resistance and its biological cost.

Materials and methods. For 46 strains of *Klebsiella pneumoniae*, 77 strains of *Pseudomonas aeruginosa* and 42 strains of *Acinetobacter baumannii*, real time polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the genes of carbapenemases, the minimum inhibitory concentrations (MIC) of meropenem and colistin were determined by broth microdilution method. The selection of resistant subpopulations on Muller–Hinton agar with the addition of 16 mg/l colistin was carried out. For colistin-resistant mutants and their isogenic sensitive strains, the kinetic parameters of growth in broth culture were determined. Incubation and result recording were performed on an Infinite M200 microplate reader for 18.5 hours at 35°C with measurement of light scatter in the wells every 15 minutes.

Results. The production of carbapenemases MBL VIM in *P. aeruginosa*, MBL NDM, KPC and OXA-48 in *K. pneumoniae*, OXA-23 and OXA-40 in *A. baumannii* was observed. All strains were sensitive to colistin (MIC varied from 0.062 to 2 mg/l). The colony growth on a selective medium with 16 mg/l colistin was observed for 97.8% of *K. pneumoniae* strains, 16.9% of *P. aeruginosa* strains, and 61.9% of *A. baumannii* strains. The mutational nature of colistin resistance was confirmed for 21.7% of *K. pneumoniae* strains. For colistin-resistant mutants of *K. pneumoniae*, a significant increase in the duration of the lag phase (T_{lag}) was observed: 225.6 ± 7.037 min in the wild-type susceptible strains and 245.5 ± 8.726 in resistant mutants, $p = 0.037$. The indicators of the doubling time of the number of microbial cells in the exponential growth phase ($T_{doubling}$) and the area under the bacterial growth curve did not differ significantly.

Conclusion. A high frequency of formation of colistin resistance *in vitro* in carbapenemase-producing strains of *K. pneumoniae* was observed. The absence of significant changes in the kinetics of microbial growth in resistant strains makes it possible to predict the further spread of mutational resistance to colistin, as well as its preservation in microbial populations of *K. pneumoniae* even in the case of limiting the use of this antibiotic.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, colistin, carbapenems, carbapenemases, mutations, resistance, biological cost

Funding source. The work was carried out within the framework of the state assignment on the subject of research work No. SR 20200311 «Study of biological and molecular genetic mechanisms of formation of resistance to polymyxins in extensively drug-resistant Gram-negative bacteria and justification of combined antibiotic therapy of caused infections».

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

For citation: Tapalski D.V., Petrovskaya T.A., Kozlov A.E. Formation *in vitro* of colistin resistance in carbapenem-resistant Gram-negative bacteria and its biological cost. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(4):426–433.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-101>

Введение

Распространение множественной и экстремальной антибиотикорезистентности среди энтеробактерий и грамотрицательных неферментирующих бактерий, связанное главным образом с продукцией карбапенемаз, привело к росту потребления полимиксинов, остающихся препаратами «последнего резерва» [1]. По данным международных сетей

по надзору за устойчивостью к противомикробным препаратам EARS-Net и CAESAR, уровень резистентности инвазивных изолятов *Klebsiella pneumoniae* к карбапенемам в 2018 г. в Беларуси был самым высоким среди европейских стран и составил 78% нечувствительных штаммов [2, 3]. В ряде исследований отмечено, что устойчивые к карбапенемам штаммы *K. pneumoniae* чаще имеют устойчи-

вость к полимиксинам по сравнению с чувствительными штаммами [1, 4]. В отчёте Европейской сети по надзору за устойчивостью к противомикробным препаратам (EARS-Net) за 2015 г. указано, что 29% устойчивых к карбапенемам *K. pneumoniae* имели устойчивость к колистину, среди карбапенемочувствительных штаммов устойчивость к колистину отмечена только у 3% [5].

Устойчивость к полимиксинам связана с мутациями в хромосомных генах, проявляющихся изменениями структуры липополисахарида и ослаблением электростатического взаимодействия колистина с наружной мембраной микробной клетки [6, 7]. В 2016 г. описана плазмидно-опосредованная устойчивость к полимиксинам. Кодированная плазмидным геном *mcr-1* фосфоэтаноламинтрансфераза модифицирует липид А, изменяя его электрический заряд, что приводит к развитию устойчивости [8]. В настоящее время во многих регионах мира отмечается широкое распространение генов *mcr* среди бактерий [9].

Развитие мутационной устойчивости к антибиотикам часто приводит к снижению жизнеспособности бактерий, что проявляется увеличением продолжительности клеточного цикла, снижением вирулентности и конкурентоспособности [10]. Так, у *Acinetobacter baumannii* устойчивость к полимиксинам связана со значительными биологическими затратами, что снижает риск распространения устойчивых штаммов и объясняет, почему устойчивость к полимиксинам остаётся относительно редкой среди клинических изолятов этого вида [11, 12]. Имеющиеся сведения о биологической стоимости устойчивости к полимиксинам у *K. pneumoniae* немногочисленны и противоречивы. Присутствие *mcr-1*-несущей плазмиды приводило к значительному сокращению конкурентоспособности *K. pneumoniae* в отношении изогенного безплазмидного штамма в эксперименте *in vitro*, а также к снижению интенсивности размножения в модели инфекции бедра у мышей с индуцированной нейтропенией [13]. Напротив, наличие плазмид, кодирующих *mcr-1* и одновременно металло-бета-лактамазу NDM, не приводило к значительным изменениям кинетики микробного роста *Escherichia coli* и *K. pneumoniae* [14]. Лабораторные колистинорезистентные мутанты *K. pneumoniae* ST23 имели меньшую устойчивость к бактерицидному действию к нормальной человеческой сыворотке крови и меньшую вирулентность по сравнению с исходными чувствительными штаммами, а также значительно сниженную конкурентоспособность [15].

Цель исследования — оценить *in vitro* интенсивность формирования устойчивости к колистину у карбапенеморезистентных клинических изолятов грамотрицательных бактерий, стабильность сфор-

мированной резистентности и её биологическую стоимость.

Материалы и методы

В исследование включены 165 устойчивых к карбапенемам штаммов грамотрицательных бактерий (46 штаммов *K. pneumoniae*, 77 штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, 42 штамма *A. baumannii*), выделенных в 2015–2019 гг. в Беларуси в ходе многоцентровых проектов. Отобранные для исследования микроорганизмы были выделены в диагностически значимых количествах из мокроты, крови, мочи, раневого отделяемого госпитализированных пациентов в Гомеле (79 штаммов), районных центрах Гомельской области (Житковичи, Жлобин, Калинковичи, Лельчицы, Мозырь, Петриков, Речица, Рогачев, Светлогорск, Хойники — 37 штаммов), Могилёве (33 штамма), Минске (10 штаммов), Витебске (6 штаммов). До проведения исследования все штаммы хранились при -62°C в бульоне с сердечно-мозговой вытяжкой с добавлением 30% глицерина.

Детекция генов карбапенемаз была выполнена методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием диагностических наборов «АмплиСенс MDR KPC/OXA-48-FL», «АмплиСенс MDR MBL-FL», «АмплиСенс MDR Ab-OXA-FL» (ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора). Идентификация и определение чувствительности к антимикробным препаратам выполнены автоматизированным методом на микробиологическом анализаторе «Vitek 2 Compact» («BioMerieux»).

Определение минимальных подавляющих концентраций (МПК) меропенема и колистина дополнительно выполнено методом серийных микроразведений в бульоне Мюллер–Хинтон («BD») в стерильных круглодонных 96-луночных планшетах в соответствии с ISO 20776-1:2006 [16].

Для определения частоты возникновения устойчивости исследуемых штаммов к колистину использовался метод [17] с модификациями. Суточные культуры исследуемых штаммов, выращенные на плотной среде (питательный агар, «HiMedia»), смывали изотоническим раствором NaCl для получения бактериальных суспензий с оптической плотностью 16 МакФарланд (контроль денситометром), что соответствует 5×10^9 микробных клеток/мл. В 90-мм полистироловые чашки Петри, содержащие 18–20 мл агара Мюллер–Хинтон с 16 мг/л колистина сульфата («Carl Roth»), вносили 100 мкл полученной суспензии. Используемая концентрация колистина в 8–256 раз превышала значения МПК колистина исследуемых штаммов. Чашки устанавливали на платформу спирального инокулятора, посев выполняли с использованием микробиологического прямого стерильного шпате-

ля, равномерно распределяя микробную суспензию по всей поверхности питательной среды при скорости вращения платформы 120–150 об/мин. Расчётная посевная доза составила 5×10^8 микробных клеток на чашку.

Посевы инкубировали 24 ч при 35°C, чашки просматривали в отражённом и проходящем свете, при наличии роста проводили подсчёт колоний. Исследование для каждого штамма выполняли в 2 повторах. Частоту возникновения резистентности рассчитывали как соотношение количества выросших колоний к посевной дозе. Диапазон измерения частоты резистентности составлял от 2×10^{-9} (1 КОЕ на чашке) до 10^{-6} (500 КОЕ на чашке и более).

Из отдельных колоний, выросших на селективной среде, содержащей 16 мг/л колистина, накапливали чистые культуры. В дальнейшем выполняли их двукратное суточное субкультивирование на среде без антибиотика и криоконсервирование. Для исключения возможной контаминации во время исследований для полученных колистинорезистентных изолятов проводилась реидентификация с использованием диагностических систем «API 20E» и «API 20NE» («BioMerieux»).

Для дифференцировки мутационной устойчивости к колистину от гетерорезистентности для полученных резистентных штаммов выполняли исследование, аналогичное популяционному профилированию [18], используя модифицированную нами сокращённую методику. Из суточных культур полученных колистинорезистентных штаммов, выращенных на плотной неселективной среде, готовили суспензии в NaCl с оптической плотностью 0,5 МакФарланд. Полученные суспензии тщательно вортиксировали и последовательно разбавляли в 5000 раз стерильным NaCl. Расчётная концентрация микробных клеток составила 3×10^3 на 1 мл. По 100 мкл полученной суспензии высевали с помощью шпателя и спирального инокулятора параллельно на чашку с агаром Мюллер–Хинтон и чашку с агаром Мюллер–Хинтон, содержащую 16 мг/л колистина сульфата. Расчётная посевная доза составила 300 микробных клеток на чашку. Посевы инкубировали 24 ч при 35°C, подсчитывали количество выросших колоний и сравнивали их количество на селективной и неселективной чашках. Исследование для каждого изолята выполняли в 2 повторах. При отсутствии роста на чашке с селективной средой либо при наличии на ней роста колоний в количестве менее 50% от количества колоний на неселективной чашке сформировавшуюся устойчивость рассматривали как вариант гетерорезистентности. Изоляты со сходным количеством колоний на селективной и неселективной среде либо отличающиеся по количеству не более чем на 50% считали мутантными, определяли для них МПК колистина

методом микроразведений в бульоне и отбирали для дальнейшего исследования.

Для оценки биологической стоимости устойчивости к колистину проводили сравнение кинетических характеристик роста в бульонной культуре для исходных колистиночувствительных штаммов (wild type, WT) и полученных из них колистинорезистентных мутантов (mut_{16}). Из суточных культур микроорганизмов, выращенных на питательном агаре, готовили суспензии в NaCl с оптической плотностью 0,5 МакФарланд. Полученные суспензии смешивали с бульоном Мюллер–Хинтон в соотношении 1 : 1500, расчётная стартовая концентрация микроорганизмов в среде составляла 10^5 микробных клеток/мл. Тестирование проводили в объёме 100 мкл в 3 повторах для каждого штамма в 96-луночных плоскодонных полистироловых планшетах с крышками («Sarstedt»). Инкубацию и учёт результатов выполняли на микропланшетном ридере «Infinite M200» («Tecan») в течение 18,5 ч при 35°C с измерением светорассеяния в лунках каждые 15 мин. Измерение светорассеяния выполняли на длине волны 600 нм (OD_{600}). Для предупреждения возможных искажений, связанных с накоплением пузырьков газа в объёме среды, каждому циклу измерения предшествовали 30-секундное орбитальное перемешивание (амплитуда 3 мм, скорость 44 об/мин) и 30-секундное отстаивание. Данные регистрировали при помощи лицензионного программного обеспечения «Magellan 7.2» («Tecan»). Для анализа параметров бактериального роста значения OD_{600} пересчитывали в концентрационные единицы (КОЕ/мл) на основе предварительно построенной в диапазоне от 0 до 2×10^9 КОЕ/мл калибровочной кривой.

Рассчитывали продолжительность лаг-периода S-образной кривой (T_{lag}), время удвоения количества микробных клеток в экспоненциальной фазе роста ($T_{doubling}$), площадь под S-образной кривой бактериального роста (AUC). Аппроксимацию зависимости концентрации микробных клеток от OD_{600} и расчёт AUC выполняли в программе «GraphPad Prism 8.3» («GraphPad Com»). Параметры T_{lag} и $T_{doubling}$ определяли с помощью программы «GrowthRates 4.3» (Bellingham Research Institute) в полулогарифмических координатах (lnКОЕ/мл). Качество аппроксимаций оценивали на основе значений квадрата коэффициента детерминации (R^2), которое во всех случаях составляло $\geq 0,99$. Для оценки значимости различий параметров бактериального роста штаммов *K. pneumoniae* WT и mut_{16} с использованием программы «GraphPad Prism 8.3» рассчитывали ранговый T-критерий Вилкоксона и соответствующий ему уровень значимости *p*.

Результаты

Включённые в исследование штаммы обладали устойчивостью к большинству антимикробных

препаратов и сохраняли чувствительность к коли-стину. Все штаммы *K. pneumoniae* являлись продуцентами карбапенемаз: КРС — 6 штаммов (13,0%), ОХА-48 — 26 штаммов (56,5%), NDM — 14 штаммов (30,4%). Все включённые в исследование штаммы *A. baumannii* продуцировали карбапенемазы группы ОХА: ОХА-23 — 2 штамма (4,8%), ОХА-40 — 39 штаммов (92,9%), ко-продукция ОХА-23 и ОХА-40 — 1 штамм (2,4%). Продукция металло-бета-лактамазы VIM выявлена у 7 из 77 штаммов *P. aeruginosa* (9,1%), у остальных штаммов устойчивость к карбапенемам не была связана с продукцией карбапенемаз.

МПК колистина, определённые методом микроразведений в бульоне, составили:

- для *K. pneumoniae* — 0,062–1,0 мг/л (МПК₅₀ — 1 мг/л, МПК₉₀ — 1 мг/л);
- для *P. aeruginosa* — 0,125–2,0 мг/л (МПК₅₀ — 0,5 мг/л, МПК₉₀ — 1 мг/л);
- для *A. baumannii* — 0,25–1,0 мг/л (МПК₅₀ — 0,5 мг/л, МПК₉₀ — 1 мг/л).

Для всех штаммов подтверждена устойчивость к меропенему, МПК меропенема находилась в диапазоне 16–1024 мг/л.

Рост колоний на селективной среде, содержащей 16 мг/л колистина, был отмечен для 97,8% штаммов *K. pneumoniae*, 16,9% штаммов *P. aeruginosa* и 61,9% штаммов *A. baumannii*. Значения частоты резистентности составили для *K. pneumoniae* от 6×10^{-9} до 10^{-6} (медиана 3×10^{-7}), для *P. aeruginosa* — 10^{-8} – 10^{-6} (медиана 2×10^{-7}), для *A. baumannii* от 4×10^{-9} до 10^{-6} (медиана 8×10^{-8}). После выполнения популяционного профилирования мутационная природа устойчивости к коли-стину подтверждена только для 10 (21,7%) штаммов *K. pneumoniae*, 2 (2,6%) штаммов *P. aeruginosa*, 2 (4,8%) штаммов *A. baumannii*, остальные случаи возникновения устойчивых субпопуляций были интерпретированы как проявление гетерорезистентности.

У большинства колистинорезистентных мутантов *K. pneumoniae* достигнутые значения МПК колистина значительно превышали концентрацию антибиотика в среде, на которой выполнялась селекция мутаций (табл. 1). Так, 7 из 10 мутантных штаммов имели МПК колистина ≥ 512 мг/л, что в

Таблица 1. Частота возникновения мутационной устойчивости к колистину у *K. pneumoniae* и МПК колистина изогенных чувствительных штаммов и колистинорезистентных мутантов

Table 1. Frequency of occurrence of mutational resistance to colistin in *K. pneumoniae* and MIC of colistin isogenic sensitive strains and colistin-resistant mutants

Штамм Strain	Частота возникновения мутационной устойчивости Mutation frequencies	МПК колистина, мг/л MIC of colistin, mg/l	
		WT	mut ₁₆
ВК-039	5×10^{-7}	1	128
ВК-080	3×10^{-7}	1	≥ 512
ВК-104	2×10^{-7}	1	≥ 512
ВК-111	10^{-6}	1	≥ 512
ВК-114	3×10^{-7}	0,5	64
ВК-117	6×10^{-8}	1	≥ 512
ВК-123	2×10^{-7}	0,5	≥ 512
ВК-148	6×10^{-8}	1	32
ВК-153	4×10^{-7}	1	≥ 512
V-377	3×10^{-7}	0,5	≥ 512

512 и более раз превышало МПК колистина изогенных чувствительных штаммов.

Для колистинорезистентных мутантов *K. pneumoniae* отмечено значимое увеличение T_{lag} . Показатели $T_{doubling}$ и AUC не имели значимых отличий (табл. 2; рисунок). Для 8 из 10 штаммов *K. pneumoniae* mut₁₆ отмечалось сокращение $T_{doubling}$, связанное с увеличением скорости размножения в экспоненциальной стадии роста в сравнении с изогенными WT-штаммами.

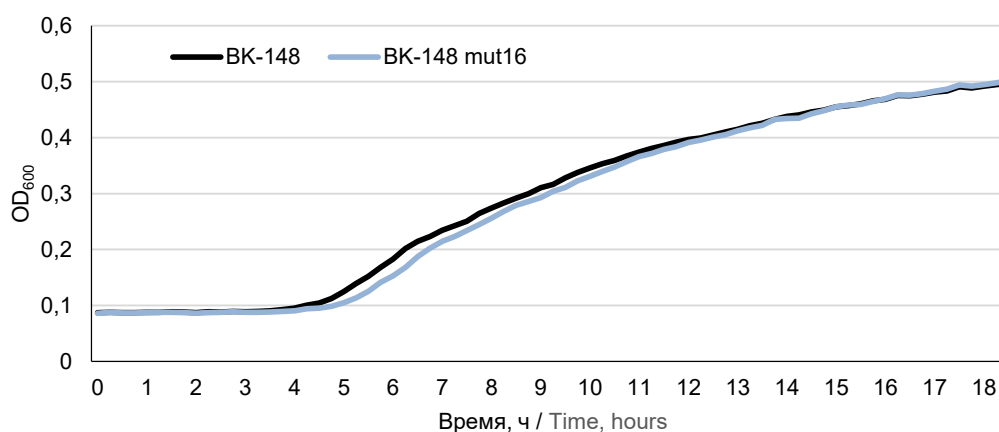
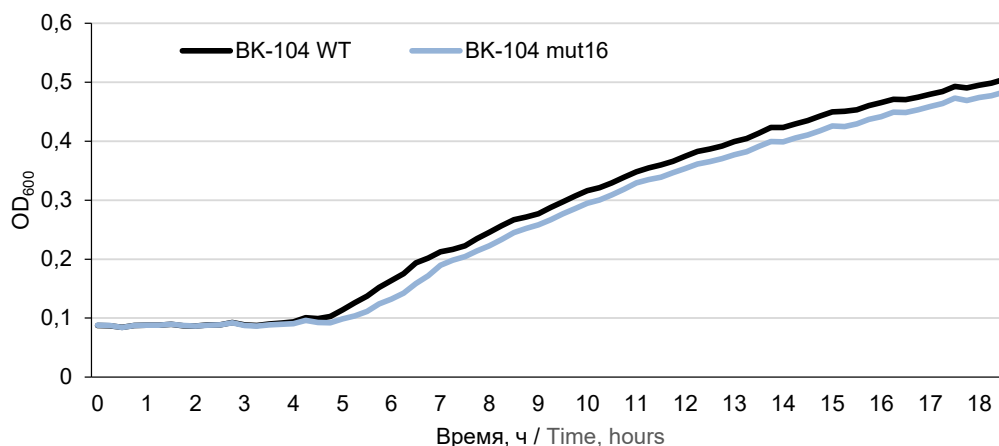
Обсуждение

Широкое распространение устойчивости к карбапенемам среди грамотрицательных бактерий ведёт к увеличению потребления полимиксинов в качестве препаратов «последнего резерва». Формирование отдельных колистинорезистентных субпопуляций в присутствии антибиотика и вытеснение ими чувствительных микроорганизмов способству-

Таблица 2. Параметры бактериального роста колистиночувствительных штаммов *K. pneumoniae* и колистинорезистентных мутантов

Table 2. Parameters of bacterial growth of colistin-sensitive *K. pneumoniae* strains and colistin-resistant mutants

Группа штаммов Group of strains	T_{lag} , мин T_{lag} , min	$T_{doubling}$, мин $T_{doubling}$, min	AUC
WT	225,6 ± 7,037	32,24 ± 0,5462	20444 ± 1159
mut ₁₆	245,5 ± 8,726	30,89 ± 0,7555	19361 ± 676,9
$P_{(WT-mut16)}$	0,037	0,065	0,770



Кинетика роста штаммов *K. pneumoniae* BK-104, BK-148 и изогенных колистинорезистентных мутантов.
Growth kinetics of *K. pneumoniae* strains BK-104, BK-148 and isogenic colistin-resistant mutants.

ет увеличению устойчивости к колистину. Сдерживающим фактором распространения устойчивости может стать её биологическая стоимость, проявляющаяся снижением интенсивности размножения, вирулентности и конкурентоспособности колистинорезистентных мутантов.

Полученные экспериментальные данные согласуются с результатами исследований, анализирующих частоту гетерорезистентности и мутационной резистентности к колистину среди карбапенеморезистентных грамотрицательных бактерий. В исследовании G. Meletis и соавт. наличие гетерорезистентности к колистину отмечено для 12 (75%) из 16 колистиночувствительных штаммов *K. pneumoniae* — продуцентов карбапенемаз КРС и VIM-1, частота возникновения резистентности составляла от $3,2 \times 10^{-7}$ до $3,5 \times 10^{-5}$ [19]. В исследовании A. Cannatelli и соавт. отмечено формирование мутационной устойчивости к колистину для продуцирующих карбапенемазы КРС-3 и OXA-48 штаммов *K. pneumoniae* с частотой от $4,7 \times 10^{-8}$ до $7,0 \times 10^{-7}$ [20]. В работе D.M. Hermes и соавт. гете-

рорезистентность к колистину выявлена только для 1 (8,3%) из 12 включённых в исследование карбапенеморезистентных штаммов *P. aeruginosa* [21]. Гетерорезистентность к колистину отмечена для 9 (20,5%) из 44 колистиночувствительных изолятов *A. baumannii*, продуцирующих карбапенемазы группы OXA. Её частота составила от $4,4 \times 10^{-6}$ до 6×10^{-4} [22].

В настоящем исследовании способность к формированию колистинорезистентных субпопуляций проявлялась главным образом среди карбапенемазопродуцирующих штаммов *K. pneumoniae* и в меньшей степени — среди *A. baumannii*. При этом по результатам популяционного профилирования мутационный характер устойчивости к колистину отмечен для 21,5% штаммов *K. pneumoniae* и только 4,8% штаммов *A. baumannii*. Достигнутые значения МПК колистина резистентных мутантов *K. pneumoniae* значительно превышали концентрацию антибиотика в среде, на которой выполнялась их селекция. Биологическая стоимость резистентности проявлялась только увеличением продол-

жительности лаг-периода. В целом интенсивность размножения исходных штаммов и изогенных колистинорезистентных мутантов была сопоставимой, что позволяет сделать заключение об отсутствии влияния развившейся устойчивости на конкурентоспособность.


Похожие данные получены в работе А. Спанателли и соавт. Сформированная *in vitro* в присутствии 16 мкг/л колистина мутационная устойчивость у карбапенемазопродуцирующих штаммов *K. pneumoniae* была связана с инактивацией регуляторного гена *mgrB*. Она развивалась у штаммов из различных клональных групп (ST16, ST258, ST512). При совместном культивировании изогенных штаммов не выявлено снижения конкурентоспособности у колистинорезистентных мутантов и сделано заключение об отсутствии значимой биологической стоимости мутационной устойчивости к колистину [21].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о достаточно высокой частоте формирования мутационной устойчивости к колистину у выделенных в Беларуси карбапенемазопродуцирующих штаммов *K. pneumoniae*, а также об отсутствии значительных изменений кинетики микробного роста у резистентных штаммов. Это в целом согласуется с результатами подобных исследований, выполненных в других странах. Можно прогнозировать дальнейшее распространение мутационной резистентности к колистину и её сохранение в микробных популяциях *K. pneumoniae* даже в случае значительного сокращения потребления антибиотика.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ / REFERENCES

- Li Z., Cao Y., Yi L., Liu J.H., Yang Q. Emergent polymyxin resistance: end of an era? *Open Forum Infect. Dis.* 2019; 6(10): ofz368. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz368>
- European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. Stockholm: ECDC; 2019.
- Central Asian and Eastern European surveillance of antimicrobial resistance. Annual report 2019. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2019.
- Stefaniuk E.M., Tyski S. Colistin resistance in *Enterobacteriales* strains – a current view. *Pol. J. Microbiol.* 2019; 68(4): 417–27. <https://doi.org/10.33073/pjm-2019-055>
- European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2015.
- Meletis G., Skoura L. Polymyxin resistance mechanisms: from intrinsic resistance to *Mcr* genes. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.* 2018; 13(3): 198–206. <https://doi.org/10.2174/1574891X14666181126142704>
- Aghapour Z., Gholizadeh P., Ganbarov K., Bialvaei A.Z., Mahmood S.S., Tanomand A., et al. Molecular mechanisms related to colistin resistance in *Enterobacteriaceae*. *Infect. Drug Resist.* 2019; 12: 965–75. <https://doi.org/10.2147/IDR.S199844>
- Liu Y.Y., Wang Y., Walsh T.R., Yi L.X., Zhang R., Spencer J., et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect. Dis.* 2016; 16(2): 161–8. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)
- Poirel L., Jayol A., Nordmann P. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clin. Microbiol. Rev.* 2017; 30(2): 557–96. <https://doi.org/10.1128/CMR.00064-16>
- Melnyk A.H., Wong A., Kassen R. The fitness costs of antibiotic resistance mutations. *Evol. Appl.* 2015; 8(3): 273–83. <https://doi.org/10.1111/eva.12196>
- Beceiro A., Moreno A., Fernandez N., Vallejo J.A., Aranda J., Adler B., et al. Biological cost of different mechanisms of colistin resistance and their impact on virulence in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014; 58(1): 518–26. <https://doi.org/10.1128/AAC.01597-13>
- Lopez-Rojas R., McConnell M.J., Jimenez-Mejias M.E., Dominguez-Herrera J., Fernandez-Cuenca F., Pachon J. Colistin resistance in a clinical *Acinetobacter baumannii* strain appearing after colistin treatment: effect on virulence and bacterial fitness. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013; 57(9): 4587–9. <https://doi.org/10.1128/AAC.00543-13>
- Nang S.C., Morris F.C., McDonald M.J., Han M.L., Wang J., Strugnell R.A., et al. Fitness cost of *mcr-1*-mediated polymyxin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2018; 73(6): 1604–10. <https://doi.org/10.1093/jac/dky061>
- Wang R., Liu Y., Zhang Q., Jin L., Wang Q., Zhang Y., et al. The prevalence of colistin resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from food animals in China: coexistence of *mcr-1* and *bla* NDM with low fitness cost. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2018; 51(5): 739–44. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.01.023>
- Choi M.J., Ko K.S. Loss of hypermucoviscosity and increased fitness cost in colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 23 strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015; 59(11): 6763–73. <https://doi.org/10.1128/AAC.00952-15>
- ISO 20776-1:2006. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems – Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices – Part 1: Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases; 2006. Available at: <https://www.iso.org/standard/41630.html>
- Oliver A., Canton R., Campo P., Baquero F., Blazquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science.* 2000; 288(5469): 1251–4. <https://doi.org/10.1126/science.288.5469.1251>
- Sherman E.X., Wozniak J.E., Weiss D.S. Methods to evaluate colistin heteroresistance in *Acinetobacter baumannii*. *Methods Mol. Biol.* 2019; 1946: 39–50. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9118-1_4
- Meletis G., Tzampaz E., Sianou E., Tzavaras I., Sofianou D. Colistin heteroresistance in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2011; 66(4): 946–7. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr007>
- Cannatelli A., Santos-Lopez A., Giani T., Gonzalez-Zorn B., Rossolini G.M. Polymyxin resistance caused by *mgrB* inactivation is not associated with significant biological cost in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015; 59(5): 2898–900. <https://doi.org/10.1128/AAC.04998-14>
- Hermes D.M., Pormann P.C., Lutz L., Teixeira A.B., Ribeiro V.B., Netto B., et al. Evaluation of heteroresistance to polymyxin B among carbapenem-susceptible and resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* 2013; 62: 1184–9. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.059220-0>
- Ezadi F., Jamali A., Heidari A., Javid N., Ardebili A. Heteroresistance to colistin in oxacillinase-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Gorgan, Northern Iran. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2020; 21: 380–5. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.11.010>

Информация об авторах

Талальский Дмитрий Викторович  — д.м.н., доцент, зав. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии Гомельского государственного медицинского университета, Гомель, Беларусь, tapalskiy@gsmu.by, <https://orcid.org/0000-0002-9484-7848>


Петровская Татьяна Александровна — ассистент каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии Гомельского государственного медицинского университета, Гомель, Беларусь, <https://orcid.org/0000-0001-6580-3603>

Козлов Александр Евгеньевич — н.с. Научно-исследовательской лаборатории Гомельского государственного медицинского университета, Гомель, Беларусь; н.с. лаб. эндокринологии и биохимии Института радиобиологии НАН Беларуси, Гомель, Беларусь, <https://orcid.org/0000-0002-3220-250X>

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 19.11.2020;
принята к публикации 10.02.2021;
опубликована 10.07.2021

Information about the authors

Dmitry V. Tapalski  — D. Sci. (Med.), Head, Department of microbiology, virology and immunology, Gomel State Medical University, Gomel, Belarus, tapalskiy@gsmu.by, <https://orcid.org/0000-0002-9484-7848>

Tatiana A. Petrovskaya — assistant, Department of microbiology, virology and immunology, Gomel State Medical University, Gomel, Belarus, <https://orcid.org/0000-0001-6580-3603>

Aleksandr E. Kozlov — researcher, Research Laboratory, Gomel State Medical University, Gomel, Belarus; researcher, Laboratory of biochemistry and endocrinology, Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Belarus, <https://orcid.org/0000-0002-3220-250X>

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 19.11.2020;
accepted for publication 10.02.2021;
published 10.07.2021

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-99>

Оценка способности холерных вибрионов формировать биоплёнку на поверхности хитинового панциря речного рака

Меньшикова Е.А.[✉], Курбатова Е.М., Водопьянов С.О., Писанов Р.В., Титова С.В.

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

Аннотация

Введение. Большинство бактерий существуют в природных экосистемах не в виде свободно плавающих клеток, а в виде прикрепленных к субстрату биоплёнок. Одним из наиболее экологически важных субстратов является хитин. *Vibrio cholerae*, как и большинство представителей семейства *Vibrionaceae*, обладают хитинолитическим комплексом и могут разлагать хитин. Способность *V. cholerae* образовывать биоплёнку на хитиновых субстратах может объяснить механизм формирования экологической ниши для сохранения и переноса возбудителя в новые регионы с вероятностью формирования новых очагов холеры.

Цель работы — методом ПЦР в режиме реального времени определить способность *V. cholerae* формировать биоплёнку на хитиновом панцире речного рака (*Astacus astacus*).

Материалы и методы. Проведён сравнительный анализ сроков образования биоплёнки *V. cholerae* различных серогрупп и токсигенности.

Результаты. Установлено, что *V. cholerae* независимо от серогруппы и токсигенности способны образовывать биоплёнку, однако токсигенные штаммы *tcpA*⁺ обладают большей интенсивностью биоплёнкообразования, чем нетоксигенные, у которых ген *tcpA* отсутствует.

Ключевые слова: холерный вибрион, биопленка, хитин, показатель биопленкообразования

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: Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М., Водопьянов С.О., Писанов Р.В., Титова С.В. Оценка способности холерных вибрионов формировать биоплёнку на поверхности хитинового панциря речного рака. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(4):434–439.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-99>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-99>

Evaluation of the ability of cholera vibrios to form a biofilm on the surface of the chitinous shell of a crayfish by real-time PCR

Elena A. Menshikova[✉], Ekaterina M. Kurbatova, Sergey O. Vodopyanov, Ruslan V. Pisanov, Svetlana V. Titova

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

Abstract

Introduction. Most of the bacteria exist in natural ecosystems not in the form of free floating cells, but in the form of biofilms attached to the substrate. One of the most ecologically important substrates is chitin. *Vibrio cholerae*, like most members of the *Vibrionaceae* family, has a chitinolytic complex and can degrade chitin. The ability of *V. cholerae* to form a biofilm on chitinous substrates can explain the mechanism of the formation of an ecological niche for the preservation and transfer of the pathogen to new regions with the likelihood of the formation of new foci of cholera.

Aim — to determine the ability of *V. cholerae* to form a biofilm on the chitinous shell of crayfish (*Astacus astacus*) by means of real-time PCR.

Materials and methods. A comparative analysis of the timing of biofilm formation by *V. cholerae* of different serogroups and toxigenicity was carried out.

Results. In the course of the study, it was found that cholera vibrios were shown to be capable of forming a biofilm regardless of the serogroup and toxigenicity. However, toxigenic tcpA⁺ strains have a higher intensity of biofilm formation than nontoxigenic ones, in which the tcpA gene is absent.

Keywords: *Vibrio cholerae*, biofilm, chitin, biofilm formation index

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: Menshikova E.A., Kurbatova E.M., Vodopyanov S.O., Pisanov R.V., Titova S.V. Evaluation of the ability of cholera vibrios to form a biofilm on the surface of the chitinous shell of a crayfish by real-time PCR. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(4):434–439.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-99>

Введение

В результате накопленных к настоящему времени экспериментальных данных некоторые исследователи стали рассматривать планктонную форму как способ перемещения микробной клетки от одной поверхности к другой, т.е. как кратковременное состояние в жизни бактерий [1]. В настоящее время известно, что большинство бактерий существуют в природных экосистемах не в виде свободно плавающих клеток, а в виде прикрепленных к субстрату биопленок [1]. Формирование биопленки — одна из стратегий выживания *Vibrio cholerae*, которая ассоциируется с повышенной стрессоустойчивостью, расширением доступа к питательным веществам и использованием её в качестве средства для распространения, когда возбудитель холеры прикрепляется к живым мобильным хозяевам [2].

М. Sultana и соавт. (2018), проводя исследования поверхностных водоёмов, пришли к выводу, что биопленки являются средством персистенции и неотъемлемой частью годового жизненного цикла *V. cholerae* в Бангладеш. При мониторинге поверхностных водоёмов в течение года авторы установили, что в весенне-летний период *V. cholerae* находятся в планктонной форме, и это совпадает с ежегодными сезонными вспышками холеры в этом регионе [3]. По данным F. Yildiz (2009), D. Srivastava (2012), переход от свободного плавания к прикрепленному образу жизни [4, 5] усиливает природную компетентность и горизонтальный перенос генов [6], а также обеспечивает повышенную защиту от хищников [7].

Особую роль в сохранении *V. cholerae* в водных экосистемах играют хитиновые покрытия членистоногих, некоторых диатомовых водорослей и грибов, на поверхности которых вибрион способен существовать в виде биопленки. Хитин — один из наиболее распространённых в природе полисахаридов. Эволюционно хитин для вибрионов служит основным питательным субстратом, а сформированные на его поверхности биопленки служат местом их обитания и убежищем от неблагоприят-

ных факторов окружающей среды. Известно, что для человека биопленки могут являться средством инфицирования при употреблении загрязнённой планктоном воды или термически необработанных морепродуктов [8–12]. Несмотря на то что в последние десятилетия получены обширные экспериментальные знания о биопленках *V. cholerae*, до сих пор нет простых и доступных методов для оценки способности формирования *V. cholerae* на поверхности хитина.

Цель работы — оценка способности *V. cholerae* формировать биопленку на поверхности хитинового панциря речного рака (по показателю биопленкообразования — ПБ) методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

Материалы и методы

Для определения способности *V. cholerae* формировать биопленку был разработан метод с использованием хитина широкопалого речного рака *Astacus astacus* в качестве биотического субстрата¹.

Фрагменты хитинового панциря речного рака размером 0,5 × 0,5 см и массой 100 мг помещали во флаконы (100 мл) с 30 мл речной воды и автоклавировали при 132°C 30 мин. Штаммы *V. cholerae* El Tor ctxA⁺tcpA⁺ № P-19613 (Инаба), № 5879 (Инаба), № 18332 (Огава), № 19241 (Инаба); ctxA⁻tcpA⁻ № 19754 (Инаба), № 20000 (Огава), № 17817 (Инаба); *V. cholerae* classical ctxA⁺tcpA⁺ № 434 (Огава) и *V. cholerae* nonO1/nonO139 ctxA⁻tcpA⁻ № 30, выделенные в разные годы от людей и из воды поверхностных водоёмов, добавляли в среду культивирования до конечной концентрации 10⁴ микробных клеток (МК) на 1 мл. Работу проводили в соответствии с требованиями биологической безопасности². Исследуемые штаммы *V. cholerae* культиви-

¹ Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М., Титова С.В. Способ моделирования биопленок формируемых *Vibrio cholerae* O1 серогруппы на поверхности хитина. Патент РФ № 2685878; 2019.

² СП 1.3.3118-13. Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности). М.; 2014.

ровали при $15 \pm 2^\circ\text{C}$, что соответствует весенне-осенней температуре в поверхностных водоёмах в Ростове-на-Дону.

Для постановки ПЦР фрагменты хитина извлекали пинцетом, трижды промывали в физиологическом растворе, несвязавшиеся клетки удаляли на листе фильтровальной бумаге и вносили в стандартные пробирки (Эппендорф) ёмкостью 1,5 мл с 1 мл физиологического раствора. Лизис клеток, включая образцы биоплёнок, проводили в соответствии с МУ 1.3.2569-09³. Полученные препараты использовали для постановки ПЦР-РВ. С целью определения количества клеток вибрионов при проведении ПЦР-РВ были использованы образцы с известным количеством искомой ДНК — стандарты, в качестве которых использовали разведения взвесей суточных культур *V. cholerae* с известной концентрацией клеток, которую определяли путём высева на агаровые пластины и последующего подсчёта КОЕ. Количество клеток в исследуемых препаратах рассчитывали автоматически с помощью программного обеспечения амплификатора «DTlite 5S1» (ДНК-технология). В качестве мишени амплификации использовали ген *hlyA* [13, 14]. ПБ рассчитывали как отношение количества МК *V. cholerae* на фрагменте хитинового панциря к их количеству в среде инкубации над хитиновыми пластинами.

Для визуализации экзополисахарида (основного компонента матрикса биоплёнки) и клеток *V. cholerae* фрагменты хитинового панциря с биоплёнкой отпечатывали на предметном стекле с помощью пинцета, после чего фрагменты хитина погружали в дезинфицирующий раствор, а покровное стекло с мазком-отпечатком фиксировали в 96° спирте в течение 20 мин. Препараты окрашивали конго красным и фуксином (оба «Интерхим»). В качестве контроля использовали планктонную форму штаммов. Исследуемые образцы изучали в световом микроскопе «Zeiss Axiostarplus» («Carl Zeiss Microscopy»).

Наличие/отсутствие роста исследуемых штаммов параллельно подтверждали бактериологическим методом, отпечатывая фрагменты хитинового панциря с биоплёнкой на агаровых пластинах (агар Мартена, pH $7,4 \pm 0,2$).

Результаты

В ходе исследования установили, что у большинства токсигенных штаммов *V. cholerae*, выделенных от человека, начало образования биоплёнки происходило со 2-х суток от начала эксперимента. ПБ этих штаммов на 2-е сутки составлял 1,0–1,7.

На 6–7-е сутки от начала эксперимента количество МК на хитиновом панцире превышало их количество в планктоне (2,4–8,1). Исключение составили штаммы *V. cholerae* El Tor № 5879 *ctxA⁺tcpA⁺*, *V. cholerae classical* № 434 *ctxA⁺tcpA⁺*, у которых максимальное количество МК на хитиновом субстрате отмечали на 35-е сутки от начала эксперимента (3,0 и 7,5 соответственно). Интересно, что эти штаммы относятся к разным сероварам (Инаба и Огава). У штаммов *ctxA⁺tcpA⁺* водного происхождения на 2-е сутки от начала эксперимента этот показатель был ниже — 0,5–0,8. К 7-м суткам инкубации ПБ токсигенных штаммов, выделенных из воды, значительно превышал этот показатель штаммов *ctxA⁺*, выделенных от человека (3,5–8,1).

У штаммов *V. cholerae* El Tor *ctxA⁻tcpA⁻* и *V. cholerae* nonO1/nonO139 водного происхождения количество МК на хитиновом панцире превышало количество МК в субстрате также на 6–7-е сутки, однако ПБ были значительно ниже, чем у токсигенных штаммов (0,1–1,7). Возможно, данный процесс у этих штаммов остановился на стадии обратимой адгезии. В течение срока наблюдения ПБ изменялся (уменьшался или увеличивался; **таблица**), следовательно, биоплёнокообразование — это динамичный процесс.

При визуализации мазков-отпечатков к 7-м суткам у токсигенных штаммов на всех микропрепаратах отмечали крупное скопление клеток *V. cholerae*, окружённых аморфным веществом (экзополисахаридом), окрашенным в ярко-розовый цвет, без чёткой формы, т.к., наслаиваясь друг на друга, они образовывали разного размера конгломераты (**рис. 1, а**).

Нетоксигенные *V. cholerae* образовывали скопления разных размеров, окружённые аморфным веществом розового цвета по всему полю зрения, однако размеры скоплений клеток и окраска экзополисахарида были менее интенсивными, чем у токсигенных штаммов (**рис. 1, б**). В контрольных пробах (планктонная форма) в микропрепаратах наблюдали единичные клетки *V. cholerae* (**рис. 2**).

Ранее нами было проведено электронно-микроскопическое исследование образцов биоплёнок *V. cholerae* O1 El Tor Inaba штамм № P-19613 *ctxA⁺tcpA⁺* и *V. cholerae* O1 El Tor Ogava штамм № P-20000 *ctxA⁻tcpA⁻*. Сравнительный анализ электронограмм показал, что образование биоплёнки на поверхности хитина у *V. cholerae* происходит независимо от наличия генов токсин-регулируемых пилей адгезии *tcpA* и холерного токсина *ctxA*, однако интенсивность биоплёнокообразования у данных штаммов различна [15].

Обсуждение

Исходя из полученных данных, токсигенный штамм *V. cholerae* O1 *ctxA⁺tcpA⁺* обладает боль-

³ МУ 1.3.2569-09. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности. М.; 2010.

ПБ *V. cholerae* на хитиновом панцире речного рака
 Biofilm formation index of *V. cholerae* on the chitinous carapace of crayfish

Штамм Strain name	Номер Number	Наличие генов <i>ctx</i> и <i>tcp</i> Presence of <i>ctx</i> and <i>tcp</i> gene	Объект выделения Source of isolation	Срок инкубации, сут Incubation time, days									
				1	2	5	6	7	17	20	25	35	
O1 El Tor	5879	<i>ctxA</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁺	Человек Human	0,5	1,0	0,9	1,1	0,4	0,8	0,8	0,8	3,0	
O1 El Tor	18332	<i>ctxA</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁺	Человек Human	0,2	1,7	1,2	0,6	2,4	0,8	0,6	0,5	0,5	
O1 El Tor	19613	<i>ctxA</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁺	Вода Water	0,3	0,8	0,4	0,5	3,5	1,3	1,0	2,4	1,0	
O1 El Tor	301	<i>ctxA</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁺	Вода Water	0,4	0,5	1,4	1,7	8,1	3,2	2,7	0,6	0,3	
O1 <i>classical</i>	434	<i>ctxA</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁺	Человек Human	0,2	1,4	0,9	2,5	1,1	3,0	2,5	2,1	7,5	
O1 El Tor	19754	<i>ctxA</i> ⁻ <i>tcpA</i> ⁻	Вода Water	0,2	0,4	0,4	0,1	0,4	0,2	0,4	0,3	0,2	
O1 El Tor	17817	<i>ctxA</i> ⁻ <i>tcpA</i> ⁻	Вода Water	0,03	0,1	0,1	0,3	0,1	0,3	0,2	0,2	0,1	
O1 El Tor	20000	<i>ctxA</i> ⁻ <i>tcpA</i> ⁻	Вода Water	0,1	1,1	1,2	1,2	1,7	0,9	1,0	0,7	0,7	
nonO/nonO139	30	<i>ctxA</i> ⁻ <i>tcpA</i> ⁻	Вода Water	0,3	1,2	0,3	1,7	0,5	0,6	0,2	0,3	0,3	

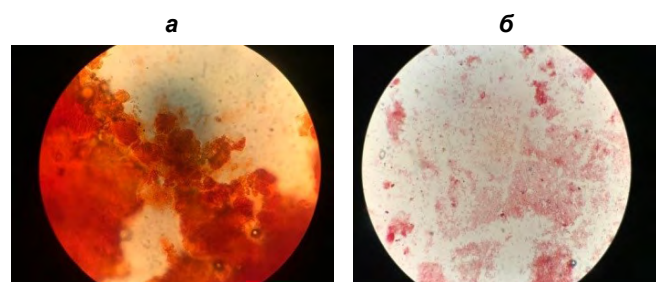


Рис. 1. Биоплёнка *V. cholerae* на хитиновом фрагменте, ×1600.

a — *V. cholerae* № 19613 *ctxA*⁺*tcpA*⁺; *b* — *V. cholerae* № 20000 *ctxA*⁻*tcpA*⁻.

Fig. 1. *V. cholerae* biofilm on a chitinous fragment, ×1600.

a — *V. cholerae* No. 19613 *ctxA*⁺*tcpA*⁺; *b* — *V. cholerae* No. 20000 *ctxA*⁻*tcpA*⁻.

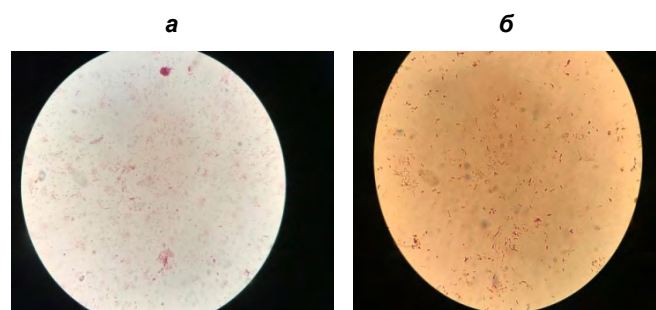


Рис. 2. Планктонная форма *V. cholerae*, ×1600.

a — *V. cholerae* № 19613 *ctxA*⁺*tcpA*⁺; *b* — *V. cholerae* № 20000 *ctxA*⁻*tcpA*⁻.

Fig. 2. Planktonic form of *V. cholerae*, ×1600.

a — *V. cholerae* No. 19613 *ctxA*⁺*tcpA*⁺; *b* — *V. cholerae* No. 20000 *ctxA*⁻*tcpA*⁻.

шей интенсивностью биоплёнкообразования, чем штаммы *V. cholerae* O1 *ctxA*⁻*tcpA*⁻. На это указывают большая толщина биопленки, объём, плотность матрикса и активность их метаболических процессов.

Такая разница в структурных образованиях биоплёнок между токсигенными и нетоксигенными штаммами, выявленная при изучении в световом микроскопе и методом трансмиссионной электронной микроскопии, свидетельствует о том, что их образование зависит в значительной степени от наличия *tcpA* в геноме штаммов *V. cholerae*, взятых в эксперимент. Это согласуется с выводами ряда авторов о большей биоплёнкообразующей способности штаммов *tcpA*⁺, что указывает на эпидемиологическую опасность биоплёнкообразования [15–19].

Заключение

Таким образом, представленные результаты подтверждают возможность использования методических приёмов, предлагаемых в работе, для оценки способности *V. cholerae* формировать биоплёнку на биотических субстратах. Способность токсигенных штаммов *V. cholerae* колонизировать поверхность хитиновых субстратов может привести к накоплению возбудителя в поверхностных водоёмах в случае завоза с эндемичных по холере территорий. Полученные результаты могут быть использованы как в фундаментальных научных исследованиях, так и в практических целях для дополнительной оценки патогенетического и персистентного потенциала штаммов *V. cholerae*.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Чернявский В.И. Бактериальные биопленки и инфекции (лекция). *Аннали Мечниковского Института*. 2013; (1): 86–90. Available at: http://www.imiamn.org.ua/journal/1_2013/PDF/18.pdf
- Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004; 2(2): 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>
- Sultana M., Nusrin S.N., Hasan A., Sadique A., Ahmed K., Islam A., et al. Biofilms comprise a component of the annual cycle of *Vibrio cholera* in the Bay of Bengal estuary. *mBio*. 2018; 9(2): e00483-18. <https://doi.org/10.1128/mbio.00483-18>
- Yildiz F.H., Visick K.L. *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. *Trends Microbiol.* 2009; 17(3): 109–18. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.12.004>
- Srivastava D., Waters C.M. A tangled web: regulatory connections between quorum sensing and cyclic di-GMP. *J. Bacteriol.* 2012; 194(17): 4485–93. <https://doi.org/10.1128/jb.00379-12>
- Lo Scudato M., Blokesch M. The regulatory network of natural competence and transformation of *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet.* 2012; 8(6): e1002778. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002778>
- Matz C., Kjelleberg S. Off the hook — how bacteria survive protozoan grazing. *Trends Microbiol.* 2005; 13: 302–7. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.05.009>
- Куликалова Е.С., Урбанович Л.Я., Саппо С.Г., Миронова Л.В., Марков Е.Ю., Мальник В.В. и др. Биопленка холерного вибриона: получение, характеристика и роль в резервации возбудителя в водной окружающей среде. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2015; 92(1): 3–11.
- Meibom K.L., Li X.B., Nielsen A.T., Wu C.Y., Rosemanand S., Schoolnik G.K. The *Vibrio cholerae* chitin utilization program. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101(8): 2524–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308707101>
- Hunt D.E., Gevers D., Vahora N.M., Polz M.F. Conservation of the chitin utilization pathway in the *Vibrionaceae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008; 74(1): 44–51. <https://doi.org/10.1128/aem.01412-07>
- Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog. Polym.* 2006; 31(7): 603–32. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
- Lutz C., Erken M., Noorian P., Sun S., McDougald D. Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio*. *Front. Microbiol.* 2013; 4: 375. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00375>
- Silva A.J., Benitez J.A. *Vibrio cholerae* biofilms and cholera pathogenesis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(2): e0004330. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004330>
- Lyon W.J. TaqMan PCR for detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 in pure cultures, raw oysters, and synthetic seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67(10): 4685–93. <https://doi.org/10.1128/aem.67.10.4685-4693.2001>
- Симонова И.Р., Головин С.Н., Титова С.В., Половцева В.С., Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М. Трансмиссионная электронная микроскопия биопленок *vibrio cholerae* на хитине. В кн.: *Холера и патогенные для человека вибрионы. Сборник статей проблемной комиссии (48.04) Координационно-научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации*. Ростов-на-Дону; 2018: 69–73.
- Shahkarami M. *Vibrio cholerae* biofilm development on natural and artificial chitin substrates. Diss. 2005. Available at: https://scholarworks.sjsu.edu/etd_theses/2839
- Sun S., Tay Q.X.M., Kjelleberg S., Rice S.A., McDougald D. Quorum sensing-regulated chitin metabolism provides grazing resistance to *Vibrio cholerae* biofilms. *ISME J.* 2015; 9(8): 1812–20. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.265>
- Nahar S., Sultana M., Naser M.N., Nair G.B., Watanabe H., Ohnishi M., et al. Role of shrimp chitin in the ecology of toxigenic *Vibrio cholerae* and cholera transmission. *Front. Microbiol.* 2011; 2: 260. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00260>
- Pruzzo C., Vezzulli L., Colwell R.R. Global impact of *Vibrio cholerae* interactions with chitin. *Environ. Microbiol.* 2008; 10(6): 1400–10. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01559.x>

REFERENCES

- Chernyavskiy V.I. Bacterial biofilms and infections (lecture). *Annaly Mechnikovskogo Instituta*. 2013; (1): 86–90. Available at: http://www.imiamn.org.ua/journal/1_2013/PDF/18.pdf (in Russian)
- Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004; 2(2): 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>
- Sultana M., Nusrin S.N., Hasan A., Sadique A., Ahmed K., Islam A., et al. Biofilms comprise a component of the annual cycle of *Vibrio cholera* in the Bay of Bengal estuary. *mBio*. 2018; 9(2): e00483-18. <https://doi.org/10.1128/mbio.00483-18>
- Yildiz F.H., Visick K.L. *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. *Trends Microbiol.* 2009; 17(3): 109–18. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.12.004>
- Srivastava D., Waters C.M. A tangled web: regulatory connections between quorum sensing and cyclic di-GMP. *J. Bacteriol.* 2012; 194(17): 4485–93. <https://doi.org/10.1128/jb.00379-12>
- Lo Scudato M., Blokesch M. The regulatory network of natural competence and transformation of *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet.* 2012; 8(6): e1002778. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002778>
- Matz C., Kjelleberg S. Off the hook – how bacteria survive protozoan grazing. *Trends Microbiol.* 2005; 13: 302–7. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.05.009>
- Kulikalo E.S., Urbanovich L.Ya., Sappo S.G., Mironova L.V., Markov E.Yu., Mal'nik V.V., et al. Cholera vibrio biofilm: production, characterization and role in reservation of causative agent in water environment. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2015; 92(1): 3–11. (in Russian)
- Meibom K.L., Li X.B., Nielsen A.T., Wu C.Y., Rosemanand S., Schoolnik G.K. The *Vibrio cholerae* chitin utilization program. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101(8): 2524–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308707101>
- Hunt D.E., Gevers D., Vahora N.M., Polz M.F. Conservation of the chitin utilization pathway in the *Vibrionaceae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008; 74(1): 44–51. <https://doi.org/10.1128/aem.01412-07>
- Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog. Polym.* 2006; 31(7): 603–32. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
- Lutz C., Erken M., Noorian P., Sun S., McDougald D. Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio*. *Front. Microbiol.* 2013; 4: 375. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00375>
- Silva A.J., Benitez J.A. *Vibrio cholerae* biofilms and Cholera pathogenesis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(2): e0004330. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004330>
- Lyon W.J. TaqMan PCR for detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 in pure cultures, raw oysters, and synthetic seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67(10): 4685–93. <https://doi.org/10.1128/aem.67.10.4685-4693.2001>
- Simonova I.R., Golovin S.N., Titova S.V., Polovtseva V.S., Men'shikova E.A., Kurbatova E.M. Transmission electron microscopy of *Vibrio cholerae* biofilms on chitin. In: *Cholera*

- and *Vibrios Pathogenic to Humans. Collection of Articles of the Problem Commission (48.04) of the Coordinating Scientific Council for Sanitary and Epidemiological Protection of the Territory of the Russian Federation [Kholera i patogennyye dlya cheloveka vibriony. Sbornik statey problemnoy komissii (48.04) Koordinatsionnogo nauchnogo soveta po sanitarno-epidemiologicheskoy okhrane territorii Rossiyskoy Federatsii]*. Rostov-na-Donu; 2018: 69–73. (in Russian)
16. Shakharami M. *Vibrio cholerae* biofilm development on natural and artificial chitin substrates: Diss. 2005. Available at: https://scholarworks.sjsu.edu/etd_theses/2839
17. Sun S., Tay Q.X.M., Kjelleberg S., Rice S.A., McDougald D. Quorum sensing-regulated chitin metabolism provides grazing resistance to *Vibrio cholerae* biofilms. *ISME J.* 2015; 9(8): 1812–20. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.265>
18. Nahar S., Sultana M., Naser M.N., Nair G.B., Watanabe H., Ohnishi M., et al. Role of shrimp chitin in the ecology of toxigenic *Vibrio cholerae* and cholera transmission. *Front. Microbiol.* 2011; 2: 260. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00260>
19. Pruzzo C., Vezzulli L., Colwell R.R. Global impact of *Vibrio cholerae* interactions with chitin. *Environ. Microbiol.* 2008; 10(6): 1400–10. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01559.x>

Информация об авторах

Меньшикова Елена Аркадьевна[✉] — к.б.н., с.н.с. лаб. экологии холерных вибрионов Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия, super.monika2007@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6003-4283>

Курбатова Екатерина Михайловна — н.с. лаб. экологии холерных вибрионов Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5268-0499>

Водопьянов Сергей Олегович — д.м.н., г.н.с., исполняющий обязанности заведующего лаб. биохимии микробов Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>

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

Тимова Светлана Викторовна — к.м.н., в.н.с. лаб. экологии холерных вибрионов Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7831-841X>

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 06.11.2020;
принята к публикации 10.02.2021;
опубликована 30.08.2021

Information about the authors

Elena A. Menshikova[✉] — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of *Vibrio cholerae* ecology, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russia, super.monika2007@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6003-4283>

Ekaterina M. Kurbatova — researcher, Laboratory of *Vibrio cholerae* ecology, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5268-0499>

Sergey O. Vodopyanov — D. Sci. (Med.), main researcher, Acting Head, Laboratory of biochemistry of microbes, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>

Ruslan V. Pisanov — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Acting Head, Laboratory for diagnostics of especially dangerous infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7178-8021>

Svetlana V. Titova — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of *Vibrio cholerae* ecology, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7831-841X>

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 06.11.2020;
accepted for publication 10.02.2021;
published 30.08.2021

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-116>

Значимость лабораторной диагностики парентеральных вирусных гепатитов в Гвинейской Республике

Бумбали С.^{1,2}, Серикова Е.Н.³, Семенов А.В.³, Останкова Ю.В.^{3*}, Валутите Д.Э.³, Щемелев А.Н.³, Зуева Е.Б.³, Балде Т.А.Л.¹, Баимова Р.Р.³, Тотолян А.А.³

¹Институт прикладной биологии Гвинеи, Киндия, Гвинейская Республика;

²Международный исследовательский центр по тропическим инфекциям в Гвинеи, Нзерекоре, Гвинейская Республика;

³Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация

Актуальность. Страны Африки, особенно к югу от Сахары, являются регионом с высокими показателями заболеваемости хроническими вирусными гепатитами В (ВГВ) и С (ВГС). Методы выявления ВГВ и ВГС в странах с низким и средним уровнем дохода отличаются от тех, которые применяют в странах, имеющих доступ к дорогостоящим технологиям. Гвинейская Республика — регион с высокой встречаемостью гепатотропных вирусов, однако данных о распространенности ВГВ и ВГС на территории крайне мало, что определило актуальность данного исследования.

Цель работы — оценить необходимость совершенствования лабораторной диагностики парентеральных ВГВ и ВГС в Гвинейской Республике.

Материалы и методы. Исследовали 2616 образцов сыворотки крови, полученных от практически здоровых жителей Гвинейской Республики в рамках плановой диспансеризации. Исследование включало качественное определение HBsAg, антител анти-HBs IgG, анти-HBcore IgG, анти-HCV IgG, а также ДНК ВГВ и РНК ВГС.

Результаты. Выявляемость серологических маркеров ВГВ и ВГС составила 80,77 и 18% соответственно. Однако HBsAg⁺ обнаружен только у 16,01% лиц. ДНК ВГВ выявляли среди как серопозитивных, так и серонегативных по другим маркерам ВГВ пациентов, ДНК ВГВ обнаружили в 22,36% случаев, в том числе в 6,07% случаев HBsAg⁺-ВГВ. РНК ВГС выявили в 2,2% случаев. Одновременно РНК ВГС и ДНК ВГВ определили у 27 человек, включая 19 HBsAg⁺-случаев, что составило 1,03% обследованной группы.

Выводы. Применяемые в настоящее время в Гвинейской Республике маркеры лабораторного выявления ВГВ и ВГС не позволяют достоверно диагностировать все случаи. Очевидна необходимость совершенствования лабораторной диагностики для своевременного обнаружения парентеральных вирусных гепатитов. Целесообразно внедрение в рутинную работу лабораторий анализа на дополнительные серологические и молекулярные маркеры ВГС и ВГВ.

Ключевые слова: вирус гепатита С, вирус гепатита В, серологические маркеры, молекулярно-биологические маркеры, лабораторная диагностика, Гвинейская Республика

Этическое утверждение. Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическими комитетами Института прикладной биологии Гвинеи и Санкт-Петербургского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (протокол № 11/15 от 12.02.2015).

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: Бумбали С., Серикова Е.Н., Семенов А.В., Останкова Ю.В., Валутите Д.Э., Щемелев А.Н., Зуева Е.Б., Балде Т.А.Л., Баимова Р.Р., Тотолян А.А. Значимость лабораторной диагностики парентеральных вирусных гепатитов в Гвинейской Республике. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2021; 98(4):440–449.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-116>

Significance of parenteral viral hepatitis laboratory diagnostics in the Republic of Guinea

Sanaba Boumbaly^{1,2}, Elena N. Serikova³, Aleksandr V. Semenov³, Yulia V. Ostankova^{3✉}, Diana E. Valutite³, Aleksandr N. Schemele³, Elena B. Zueva³, Thierno A.L. Balde¹, Regina R. Baimova³, Areg A. Totolian³

¹Institute of Applied Biological Research of Guinea, Kindia, Republic of Guinea;

²Centre International de Recherche sur les Infections Tropicales en Guinée, Nzérékoré, Republic of Guinea;

³St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia

Abstract

Rationale. Countries of Africa, especially countries in sub-Saharan Africa, represent a region characterized by high incidence of chronic hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV) infections. Methods for detection of HBV and HCV in low and middle-income countries differ from those that are used in countries having access to high-cost technologies. The Republic of Guinea is a region with high prevalence of hepatotropic viruses; however, the information on HBV and HCV prevalence in the area is extremely limited, thus emphasizing the significance of this study.

The purpose of the study is to evaluate the need for improving laboratory diagnostics of parenteral HBV and HCV infections in the Republic of Guinea.

Materials and methods. A total of 2,616 samples of blood serum were tested; the samples were collected from apparently healthy residents of the Republic of Guinea during the routine medical checkup. The testing included qualitative detection of HBsAg, anti-HBs IgG, anti-HBcore IgG, anti-HCV IgG antibodies as well as HBV DNA and HCV RNA.

Results. The detection frequency of serological markers of HBV and HCV infections was 80.77% and 18%, respectively. However, HBsAg was detected only in 16.01% of individuals. Tests for detection of HBV DNA were performed among seropositive patients and patients seronegative by other HBV markers, HBV DNA was detected in 22.36% of cases, including 6.07% of HBsAg-negative cases. HCV RNA was detected in 2.2% of cases. Both HCV RNA and HBV DNA were detected in 27 people, including 19 HBsAg-negative cases, thus accounting for 1.03% of the examined group.

Conclusions. The markers that are currently used for laboratory detection of HBV and HCV in the Republic of Guinea are not efficient enough to diagnose reliably all cases. Undoubtedly, there is an urgent need to improve laboratory diagnostics for timely detection of parenteral viral hepatitis. Routine laboratory operations need assays for additional serological and molecular markers of HCV and HBV infections.

Keywords: hepatitis C virus, hepatitis B virus, serological markers, molecular markers, laboratory diagnostics, the Republic of Guinea

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committees of Institute of Applied Biological Research of Guinea and St. Petersburg Pasteur Institute (protocol 11/15, 12.02.2015).

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: Boumbaly S., Serikova E.N., Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Valutite D.E., Schemele A.N., Zueva E.B., Balde T.A.L., Baimova R.R., Totolian A.A. Significance of parenteral viral hepatitis laboratory diagnostics in the Republic of Guinea. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(4):440–449.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-116>

Введение

За последние десятилетия значительно возросло бремя вирусных гепатитов, и к настоящему времени они являются 7-й по значимости причиной смертности в мире. По оценкам ВОЗ, 1,4 млн смертей в год вызваны острой и хронической формами вирусных гепатитов В (ВГВ) и С (ВГС)¹. В их чис-

ле — смерти, связанные с раком и циррозом печени. Из них примерно 47% обусловлены ВГВ, а 48% — ВГС. По предварительным расчётам, совокупная смертность от вирусных гепатитов в 2015–2030 гг. может составить приблизительно 20 млн человек².

<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b> (access date: 26.12.2020).

¹ World Health Organization. Hepatitis C. Key facts. <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c> (access date: 26.12.2020); World Health Organization. Hepatitis B. Key facts.

² CDC: How viral hepatitis impacts millions of people worldwide. <https://www.cdc.gov/hepatitis/awareness/worldhepday.htm> (access date: 26.12.2020).

Хронические гепатиты В (ХГВ) и С (ХГС) относятся к заболеваниям с парентеральным механизмом передачи патогена, под которым понимают передачу вируса с кровью и/или другими жидкостями организма при обязательном повреждении кожных покровов или слизистых оболочек. К естественным путям передачи относят половой (прямой сексуальный контакт), вертикальный (от матери плоду во время или после родов, пренатальный (трансплацентарный), а также бытовой путь, в том числе прямой и непрямой, включающий пользование общими с инфицированным лицом предметами гигиены и контакты. К искусственным путям причисляют заражение при внутривенном введении психоактивных веществ, при медицинских манипуляциях с использованием инструментов, контаминированных заражённой кровью, переливании крови и её компонентов и т.д. [1].

ВГВ и ВГС способны приводить как к острым, так и к хроническим заболеваниям печени, в обоих случаях при острой стадии инфекции большинство людей не испытывают никаких симптомов [2]. Согласно данным общемировой статистики, около 15–45% инфицированных ВГС могут спонтанно выздороветь в течение 6 мес после заражения без лечения. У остальных 55–85% людей развивается ХГС [3]. ХГВ очень распространён при инфицировании в период младенчества или в возрасте до 5 лет, когда вероятность хронизации острого гепатита В (ОГВ) — более 90%. Инфекция, развивающаяся в зрелом возрасте, может привести к хроническому гепатиту менее чем в 5% случаев [4].

ВГВ и ВГС встречаются по всему миру, их распространённость различается в зависимости от региона. Регионами с высокими показателями заболеваемости ХГВ и ХГС являются страны Африки, особенно к югу от Сахары. В настоящее время при диагностике вирусных гепатитов национальными клиническими рекомендациями предписывается выполнение комплекса лабораторных исследований, позволяющих оценить как функциональное состояние печени, так и идентифицировать патоген и его состояние [5]. Следует отметить, что методы выявления ВГВ и ВГС, а также диагностика заболеваний печени, связанных с ними, в странах с низким и средним уровнем дохода существенно отличаются от тех, которые применяются в странах, имеющих доступ к дорогостоящим технологиям, требующим специализированного оборудования и квалифицированного персонала. Большинство исследований на эту тему в странах Африки ограничивается измерением поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) и антител к гепатиту С (анти-HCV IgG), в то время как молекулярно-генетические методы, позволяющие более точно оценить распространённость вирусов, доступны только в центральных лабораториях крупных городов [6]. Кроме того,

даже данные о распространении серологических маркёров ВГВ и ВГС в популяции практически отсутствуют, поскольку серологический скрининг часто проводят только в отдельных группах населения — группах риска (ВИЧ-инфицированные лица, заключённые, потребители инъекционных наркотиков и т.д.) и группах, распространённость инфекции в которых оказывает существенное влияние на здоровье населения (доноры крови, беременные женщины).

Гвинея является регионом с высокой встречаемостью гепатотропных вирусов, однако данных о распространённости ВГВ и ВГС на данной территории крайне мало, что определило актуальность данного исследования.

Целью нашей работы было оценить необходимость совершенствования лабораторной диагностики парентеральных ВГВ и ВГС в Гвинейской Республике.

Материалы и методы

Материалом исследования служили 2616 образцов сыворотки крови, полученные от практически здоровых лиц, проживающих на территории Гвинейской Республики. Образцы получали с апреля 2015 г. по октябрь 2020 г. от людей без подозрения на болезнь, вызванную вирусом Эбола. Все обследованные лица являлись коренными жителями Гвинейской Республики, представлены преимущественно народностями фульбе, малинке и сусу.

Возраст обследованных лиц варьировал от 1 до 65 лет и составил в среднем $32,7 \pm 16,4$ года. Количество мужчин в группе преобладало по сравнению с женщинами — 67,97 и 32,03% (95% ДИ 66,15–69,73) соответственно.

Обследованные лица отрицали инфицирование ВГВ и ВГС в анамнезе. Кровь получали из локтевой вены натошак в количестве 5 мл с использованием вакуумной системы для взятия крови в одноразовую пробирку с антикоагулянтom K_2 -ЭДТА. Для отделения плазмы кровь центрифугировали при 4°C со скоростью вращения 3000 об/мин в течение 10 мин. Пробы аликвотировали в криопробирки для хранения при –20°C и дальнейших исследований: для ИФА — 500 мкл, для ПЦР — 300 мкл. Транспортировку образцов производили в специализированных контейнерах для транспортировки биоматериала при 4–8°C.

Лабораторные исследования проводили на базе Российско-Гвинейского научного исследовательского центра эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней Института прикладной биологии Гвинеи. На проведение данного исследования было получено согласие локального Этического комитета Института IRBAG и НИИЭМ им. Пастера. Все обследованные дали письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Обследование крови пациентов на наличие серологических маркёров вирусных гепатитов методом ИФА заключалось в качественном определении HBsAg, антител анти-HBs IgG, антител анти-HBcore IgG, антител анти-HCV IgG с использованием коммерческих наборов «ДС-ИФА-HBsAg», «ДС-ИФА-АНТИ-HBsAg», «ДС-ИФА-АНТИ-HBc», «ИФА-АНТИ-HCV» (НПО «Диагностические Системы») и «Вектогеп В-HBs-антиген», «ВектоHBsAg-анти-тела», «ГепаБест анти-HBc-IgG», «Бест анти-ВГС» (АО «Вектор-Бест») согласно инструкциям производителей.

Обследование на наличие молекулярно-биологических маркёров методом ПЦР осуществляли с предварительным выделением ДНК ВГВ и РНК ВГС с использованием коммерческого набора «АмплиПрайм Рибо-преп» (ЦНИИ Эпидемиологии). РНК ВГС определяли методом ПЦР с гибридационно-флюоресцентной детекцией в режиме реального времени с помощью коммерческого набора «АмплиСенс® HCV-FL» (ЦНИИ Эпидемиологии) согласно инструкции к набору. Определение ДНК ВГВ первично проводили методом ПЦР с гибридационно-флюоресцентной детекцией в режиме реального времени с помощью коммерческого набора «АмплиСенс® HBV-FL» (ЦНИИ Эпидемиологии) согласно инструкции производителя. В дальнейшем использовали разработанную в НИИЭМ им. Пастера методику, позволяющую выявлять ДНК ВГВ в биологическом материале при низкой вирусной нагрузке, в том числе при HBsAg-негативном или оккультном ХГВ [7]. Нуклеотидные последовательности полных геномов некоторых (трех) выявленных в ходе работы изолятов ВГВ от HBsAg-негативных лиц были депонированы в международную базу данных GenBank под номерами MN507840–MN507842.

Статистическую обработку данных производили с помощью пакета программ «MS Excel»,

«Prizm 5.0» («GraphPad Software Inc.»), «Statistica 8.0» («StatSoft Inc.»). Для оценки достоверности различий числовых данных, полученных при парных сравнениях, использовали, в зависимости от характеристик выборок, точный критерий Фишера или критерий χ^2 с поправкой Йетса. В качестве порога достоверности отличий было определено значение вероятности $p < 0,05$.

Результаты

При оценке общей распространённости серологических маркёров среди пациентов встречаемость маркёров ВГВ составила 80,77%, маркёров ВГС — 18%. Выявление одновременно серологических маркёров ВГВ и ВГС показано у 5,12% лиц, т.е. у 6,34% пациентов с серопозитивными маркёрами ВГВ. Однако HBsAg⁺ обнаружен только у 16,01% лиц. Одновременное выявление HBsAg⁺ и анти-HCV IgG показано у 2,75% обследованных, т.е. у 3,4% HBsAg⁺-лиц.

Результат анализа распределения исследованных маркёров ВГВ в обследованной группе представлен в **таблице**.

При оценке распространённости серологических маркёров в зависимости от пола было показано, что в целом они встречаются у 80,93% мужчин и 80,42% женщин, HBsAg⁺ выявлены у 18,61% мужчин и 10,5% женщин, антитела анти-HCV представлены у 19,06% мужчин и 15,75% женщин.

Мы не выявили различий во встречаемости серологических маркёров ВГВ в целом в зависимости от пола, встречаемость высока и у мужчин (80,93%), и у женщин (80,42%). Однако распространённость HBsAg⁺ у мужчин (18,61%) достоверно превышает таковую у женщин (10,5%), $\chi^2 = 27,285$, $p < 0,0001$, $df = 1$. Относительный риск инфицирования ВГВ с формированием HBsAg⁺-формы ХГВ у мужчин выше, чем у женщин: $RR = 1,773$, $p < 0,0001$, 95% ДИ 1,422–2,210.

Распределение серологических маркёров ВГВ в обследованной группе и среди серопозитивных по ВГВ лиц
Distribution of HBV serological markers in the examined group and among HBV seropositive patients

Выявленные серологические маркёры в сыворотке крови Detected serological markers in the blood serum	Обследованная группа ($n = 2616$), доля от общего числа обследованных, % Examined group ($n = 2,616$), percentage of the total number of examined	Серопозитивные пациенты ($n = 2113$), доля от лиц с маркёрами ВГВ, % Seropositive patients ($n = 2,113$), percentage of patients with HBV markers
HBsAg ⁺	2,14	2,65
HBsAg ⁺ , HBcore IgG ⁺	8,18	10,13
HBsAg ⁺ , HBs IgG ⁺	1,95	2,41
HBs IgG ⁺	7,99	9,89
HBcore IgG ⁺	40,82	50,54
HBcore IgG ⁺ , HBs IgG ⁺	15,94	19,73
HBsAg ⁺ , HBcore IgG ⁺ , HBs IgG ⁺	3,75	4,64
Серонегативные Seronegative	19,23	—

В обследованной группе лиц выявлено достоверное превышение встречаемости анти-НСV у мужчин (19,06) по сравнению с женщинами (15,75%): $\chi^2 = 4,017$, $p = 0,045$, $df = 1$, $RR = 1,21$, 95% ДИ 1,007–1,454.

При оценке распространённости серологических маркёров по возрастным группам показано, что среди ВГВ-серопозитивных пациентов 12,97% составили дети до 18 лет, 3,03% — лица в возрасте 18–22 лет, 43,02% — 23–40 лет, 40,98% — старше 41 года. Таким образом, в группе детей до 18 лет частота встречаемости серопозитивных маркёров ВГВ составила 70,43%, среди пациентов в возрасте 18–22 лет — 54,7%, 23–40 лет — 79,59%, старше 41 года — 89,46%.

В нашем исследовании встречаемость серологических маркёров ВГВ оказалась в целом сопоставима среди обследованных в возрасте 23–40 лет (79,59%) и в возрастной группе старше 41 года (89,46%), однако риск выявления серологических маркёров ВГВ среди лиц старше 41 года несколько выше: $\chi^2 = 37,444$, $p < 0,0001$, $df = 1$, $RR = 1,124$, 95% ДИ 1,084–1,166. Встречаемость маркёров в детско-юношеской группе (возраст 1–18 лет) несколько ниже (70,43%). Вероятность выявления серологических маркёров ВГВ среди лиц в возрасте 23–40 лет выше, чем в детской группе: $\chi^2 = 13,346$, $p = 0,0003$, $df = 1$, $RR = 1,13$, 95% ДИ 1,053–1,213. Очевидно, что вероятность ещё выше в группе старше 41 года по сравнению с группой до 18 лет: $\chi^2 = 73,36$, $p < 0,0001$, $df = 1$, $RR = 1,27$, 95% ДИ 1,187–1,359.

При обследовании образцов на наличие ДНК ВГВ с использованием коммерческого набора «АмплиСенс® HBV-FL» вирус был выявлен в 426 (16,28%) образцах, в том числе во всех HBsAg⁺-образцах и у 7 HBsAg-негативных пациентов. При использовании разработанного в НИИЭМ им. Пастера метода выявления ДНК ВГВ при низкой вирусной нагрузке вирус был обнаружен ещё у 159 (6,07%) человек, серонегативных по результатам ИФА и коммерческого ПЦР-теста. Таким образом, ДНК ВГВ выявлен у 585 (22,36%) человек. ДНК ВГВ выявлялся как среди серопозитивных, так и среди серонегативных по другим маркерам ВГВ пациентов.

Среди анти-НСV⁺-лиц не представлены дети до 18 лет, лица в возрасте 18–22 лет составили 2,97% случаев, 23–40 лет — 55,2%, старше 41 года — 41,82%. Обнаружено увеличение встречаемости анти-НСV антител с возрастом — отсутствие антител в группе до 18 лет, 11,96% среди обследованных в возрасте 18–22 лет, 22,76% — 23–40 лет, 20,35% — старше 41 года. При сравнительном анализе, например, групп обследованных 18–22 и 23–40 лет обнаружено повышение выявляемости анти-НСV IgG — $\chi^2 = 6,651$, $p = 0,0099$, $df = 1$, $RR = 1,903$, 95% ДИ 1,150–3,147.

При обследовании образцов на наличие РНК ВГС с использованием коммерческого набора «АмплиСенс® HCV-FL» вирус был выявлен в 58 (2,2%) образцах.

Одновременно РНК ВГС и ДНК ВГВ выявили у 27 (1,03%) человек, включая 19 HBsAg⁻-случаев.

Обсуждение

Основным лабораторным маркером диагностики ВГВ является определение его поверхностного антигена (HBsAg), встречаемость которого в популяции варьирует в зависимости от географического региона. Обнаружение HBsAg в крови рассматривается как признак активности вируса. В периферической крови HBsAg может быть обнаружен за 2–4 нед до появления клинических признаков заболевания. Его концентрация при ОГВ достигает максимальных значений, а затем в среднем в течение 4–6 мес снижается до неопределяемого коммерческими тест-системами уровня при наступлении реконвалесценции или клиренса HBsAg. Однако необходимо иметь в виду, что отсутствие определяемого уровня HBsAg в периферической крови не означает полного выздоровления, т.к. может свидетельствовать также о развитии оккультного ХГВ [8, 9]. Оккультный, или HBsAg⁻-ХГВ характеризуется недетектируемым уровнем HBsAg в плазме крови при наличии ДНК ВГВ в ткани печени и крайне низким уровнем вирусной нагрузки в крови вплоть до неопределяемого, независимо от наличия или отсутствия иных серологических маркёров [10]. Антитела к HBsAg (анти-HBs IgG) и их количественное определение в крови используют как маркер перенесённого ВГВ либо как свидетельство вакцинации против вируса. Антитела к HBcAg (анти-HBcore IgG) являются косвенным маркером контакта пациента с ВГВ при отрицательных результатах других маркёров [11].

Выявленный в нашей работе уровень распространённости HBsAg среди условно здоровых лиц составил 16,01%, что совпадает с исследованиями конца XX в., согласно которым распространённость HBsAg в разных регионах Гвинейской Республики в среднем составляла 16,7% [12]. Таким образом, за последние два десятилетия уровень встречаемости HBsAg в регионе оставался стабильно высоким. Ранее было показано, что распространённость HBsAg в странах Африки у мужчин превышает таковую у женщин, особенно в сельских районах, что связывали с различиями в племенном и сексуальном поведении между мужчинами и женщинами [13, 14]. Можно было бы предположить, что отсутствие достоверных гендерных различий в частоте встречаемости серологических маркёров ВГВ в нашей работе может быть связано с тем, что обследуемый контингент нельзя уверенно отнести к проживающим в сельской местности, а также с более

высоким уровнем образования и сравнительной универсализацией поведения людей, работающих в горнодобывающей индустрии. По всей видимости, социальные особенности обследуемой группы не играют достаточно значимой роли для снижения уровня распространённости вируса в целом, как и для нивелирования разницы во встречаемости HBsAg между полами. При этом сходство распространённости анализируемых серологических маркеров суммарно свидетельствует лишь о том, что ситуация по ВГВ в регионе в целом не отличается от ситуации в других странах Западной Африки, где ХГВ выявляется у 10–25% жителей, а более 75% населения контактировали с вирусом [15]. Согласно выявленным серологическим маркерам, HBsAg⁺-ХГВ выявлен у 16,01% лиц обследованной группы, т.е. у 19,83% серопозитивных лиц, а у лиц, контактировавших с ВГВ без HBs-антигенемии (HBsAg⁻, HBscore IgG⁺) и у реконвалесцентов ОГВ (HBsAg⁻, HBscore IgG⁺, HBs IgG⁺) — у 56,76% обследованной группы, т.е. 70,27% серопозитивных лиц, что подтверждается обнаружением антител только в 15,94% случаев. Среди пациентов обследованной нами группы контактировали с ВГВ 72,78% лиц.

Оценка распространённости вируса, по данным литературы, среди населения может варьировать в зависимости не только от пола, но и от возраста. Так, в сельских районах на юго-западе Чада общая распространённость HBsAg составила 22,9%, при этом самая молодая возрастная группа (6–15 лет) и группа мальчиков/мужчин показали значительно более высокую распространённость HBsAg по сравнению со старшими группами и группой девочки/женщины ($p < 0,01$) [16].

Полученные нами результаты относительно распространённости маркеров ВГВ среди возрастных групп согласуются с данными литературы, согласно которым ВГВ в Африке передается в основном в раннем возрасте, дети подвергаются высокому риску инфицирования ВГВ за счет парентеральной горизонтальной передачи (в том числе контактно-бытовой), особенно в возрасте 2–10 лет [17]. Вероятно, дети с высоким уровнем вирусемии передают вирус через порезы и ссадины восприимчивым братьям, сёстрам, друзьям по играм. Хотя горизонтальная передача представляет собой основную путь передачи вируса, считается, что перинатальным путем инфицирования обусловлено формирование около 10% случаев хронической инфекции, а низкий уровень встречаемости HBeAg у HBsAg⁺-беременных женщин в большинстве африканских стран коррелирует с низкой частотой перинатальной передачи. При этом 20–30% пациентов, инфицированных в раннем детстве, становятся хроническими носителями и только 10% из них остаются HBeAg⁺ в подростковом возрасте [18]. Однако из общей картины выпадают данные, полученные для

группы 18–22 лет, распространённость серологических маркеров в которой составила всего 54,7%. В то же время эта возрастная группа была наименее представительной среди обследуемых лиц в целом. По всей видимости, значительное снижение встречаемости серопозитивных маркеров ВГВ в данной группе связано с ограниченностью выборки, что свидетельствует о необходимости тщательного анализа и подбора обследуемых групп.

Отметим, что встречаемость HBsAg⁺ среди лиц до 18 лет в нашем исследовании составила 16,9%, что дополнительно подтверждает преимущественное инфицирование в детском возрасте, и незначительно превышает соответствующий показатель у детей из Южной Африки (15,7%), распространённость у которых считается наибольшей из описанных в литературе [19]. Интересно, что в африканских странах распространённость HBsAg⁺ среди младенцев (16,3%) и доноров крови (23,4%) может значительно превышать популяционную (13,6%), как это описано в Нигерии [20].

К молекулярно-биологическим маркерам, применяемым для диагностики вирусных гепатитов, прежде всего относится метод ПЦР. Определённый нами с помощью коммерческого набора «Ампли-Сенс® HBV-FL» уровень распространённости ДНК ВГВ в группе (16,28%) сопоставим с уровнем выявления HBsAg (16,01%), хотя были выявлены также 7 HBsAg⁻-ДНК ВГВ⁺-пациентов, что свидетельствует в целом о более высокой чувствительности метода ПЦР по сравнению с классическим алгоритмом диагностики ВГВ, основанным на выявлении HBsAg методом ИФА. Тем не менее о недостаточной чувствительности этих методов свидетельствует выявление ДНК ВГВ дополнительно ещё у 159 серонегативных человек (6,07% общей выборки) при использовании разработанного в НИИЭМ им. Пастера метода выявления ДНК ВГВ при низкой вирусной нагрузке. Встречаемость ДНК ВГВ в нашей группе (22,36%), таким образом, превышает ранее опубликованные данные о распространённости вируса в регионе [12]. Хотя, по мнению некоторых авторов, гетерогенность результатов, полученных разными исследователями в одной стране, связана прежде всего с географическими регионами, социализацией и внедрением универсальной иммунизации, а не с полом больных, методами и тактикой скрининга маркеров ВГВ и методологическим качеством исследований [21], мы считаем, что различия в результатах могут быть следствием различий в применяемых методах лабораторной диагностики. Выявленный высокий уровень встречаемости оккультной формы ХГВ в обследуемой группе характерен для регионов, где вирус наиболее широко распространён. Обращают на себя внимание случаи выявления ДНК ВГВ у пациентов с единственным позитивным маркером — анти-HBs-

IgG, наличие которого в периферической крови без иных серологических маркёров обычно трактуют как показатель иммунного ответа, вызванного вакцинацией против ВГВ, а также 6 случаев выявления ДНК ВГВ у пациентов с анти-НВs⁺-IgG, анти-НВcore⁺-IgG, сочетание которых должно свидетельствовать о наличии протективного иммунитета реконвалесцентов ОГВ.

Скрининговая лабораторная диагностика ВГС основана на выявлении антител к вирусу с возможным подтверждением сомнительного результата анализом на антитела к специфическим белкам вируса методом иммунного блоттинга. Выявление РНК ВГС является методом диагностики, применяемым для сокращения периода «серологического окна» либо для разделения реконвалесцентов ОГС и пациентов с ХГС [22].

В нашей работе распространённость анти-НСV IgG составила 18%, что значительно превышает опубликованные ранее данные [23]. Полученные нами результаты о превышении встречаемости анти-НСV у мужчин по сравнению с женщинами противоречат данным литературы относительно значимости пола обследуемых для встречаемости ВГС, но согласуются относительно более старшего возраста как фактора риска серопозитивности [24].

Следует отметить, что используемые нами в данной работе наборы «ИФА-анти-НСV» выявляют суммарные антитела к белкам ВГС, что недостаточно для достоверного определения всех маркёров ВГС, и результаты нуждаются в подтверждении, например выявлении специфических антител к белкам ВГС методом иммуноблоттинга. По всей видимости, большую часть выявленных случаев можно отнести к серопозитивным реконвалесцентам ОГС либо к пациентам с ХГС с вирусной нагрузкой ниже предела детекции применяемой коммерческой тест-системы для выявления РНК ВГС (100 МЕ/мл), т.к. РНК ВГС удалось выявить у 2,21% обследованных лиц (12,31% анти-НСV⁺-случаев). Низкая распространённость ВГС характерна для данного географического региона [24]. Однако, как и в случае с ВГВ, возможна распространённость ВГС с низкой вирусной нагрузкой, которую мы не можем определить, используя коммерческие тест-системы. Косвенным подтверждением этого может служить выявленное различие распространённости анти-НСV в возрастных группах, а также тенденция к повышенной встречаемости анти-НСV у мужчин по сравнению с женщинами, что, очевидно, может быть связано с социально-поведенческими особенностями жителей региона. Для того чтобы проверить вероятность такого предположения, необходимо провести исследования, используя nested-ПЦР, что позволит увеличить чувствительность метода и выявить РНК ВГС при низкой нагрузке. Дополнительные исследования в виде анализа РНК ВГС в мононуклеарах

крови также позволили бы с большей точностью оценить встречаемость патогена в регионе [22].

Говоря о встречаемости в регионе парентеральных вирусных гепатитов, необходимо упомянуть о высокой распространённости в странах Африки гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК), играющей значимую роль в структуре летальности, связанной с болезнями печени. Самой пострадавшей страной считают Гамбию, за ней следуют Гвинейская Республика, Либерия и Сьерра-Леоне [25]. В то время как в странах Европы и Америки ГЦК связана преимущественно с ВГС, в странах Африки значительно чаще причиной ГЦК становится ВГВ [26, 27]. Особенно значимым представляется оккультный ХГВ, обнаруживаемый более чем у 75% НВsAg⁻-больных ГЦК [28], — большинство больных ГЦК в регионе умирают в течение нескольких недель после постановки диагноза, т.е. смертность от ГЦК сравнима с заболеваемостью. Это связано с ранним заражением ВГВ, поздним обнаружением вируса, запоздалым обращением к врачам и неправильным лечением, в том числе по причине недостаточного применения в регионе диагностических методов.

Заключение

Анализируя распространённость серологических и молекулярно-биологических маркёров ВГВ и ВГС в Гвинейской Республике, мы вынуждены заключить, что исследования в регионе ограничены не только небольшим числом обследованного контингента, но и применяемыми диагностическими тестами. Очевидны высокая значимость и необходимость совершенствования лабораторной диагностики для своевременного выявления парентеральных вирусных гепатитов, как и необходимость внедрения в рутинную работу лабораторий анализа на дополнительные серологические и молекулярные маркёры ВГС и ВГВ. Внедрение усовершенствованных молекулярно-биологических технологически сложных методов позволит получить дополнительные данные, что будет способствовать пониманию молекулярной эпидемиологии инфекционного процесса и разработке программ по профилактике и лечению инфекций.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. WHO. Prevention and control of viral hepatitis infection: framework for global action 2012. Geneva; 2012.
2. Мукомолов С.Л., Левакова И.А. Эпидемиологическая характеристика хронических вирусных гепатитов в Российской Федерации в 1999–2009 гг. *Инфекция и иммунитет*. 2011; 1(3): 255–62. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2011-3-255-262>
3. Zabala V., Tong M., Yu R., Ramirez T., Yalcin E.B., Balbo S., et al. Potential contributions of the tobacco nicotine-derived nitrosamine ketone (NNK) in the pathogenesis of steatohepatitis in a chronic plus binge rat model of alcoholic liver disease. *Alcohol Alcohol*. 2015; 50(2): 118–31. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agu083>

4. Yim H.J., Lok A.S. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what we knew in 1981 and what we know in 2005. *Hepatology*. 2006; 43(2 Suppl. 1): S173–81. <https://doi.org/10.1002/hep.20956>
5. Юшук Н.Д., Климова Е.А., Знойко О.О., Кареткина Г.Н., Максимов С.Л., Маев И.В. *Вирусные гепатиты: клиника, диагностика, лечение*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2012.
6. Allain J.P., Opare-Sem O. Screening and diagnosis of HBV in low-income and middle-income countries. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2016; 13(11): 643–53. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.138>
7. Останкова Ю.В., Семенов А.В., Тотолян А.А. Выявление вируса гепатита В в плазме крови при низкой вирусной нагрузке. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(10): 635–40. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-10-635-640>
8. Семенов А.В., Останкова Ю.В. Оккультный (скрытый) гепатит В: проблемы лабораторной диагностики. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2019; 8(3): 60–9. <https://doi.org/10.24411/2305-3496-2019-13010>
9. Morales-Romero J., Vargas G., García-Román R. Occult HBV infection: a faceless enemy in liver cancer development. *Viruses*. 2014; 6(4): 1590–611. <https://doi.org/10.3390/v6041590>
10. Raimondo G., Locarnini S., Pollicino T., Levrero M., Zoulim F., Lok A.S., et al. Taormina workshop on occult HBV infection faculty members. Update of the statements on biology and clinical impact of occult hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 2019; 71(2): 397–408. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.03.034>
11. Shi Y.H., Shi C.H. Molecular characteristics and stages of chronic hepatitis B virus infection. *World J. Gastroenterol.* 2009; 15(25): 3099–105. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.30991>
12. Sylla A., Diallo M.S., Castegnaro J., Wild C.P. Interactions between hepatitis B virus infection and exposure to aflatoxins in the development of hepatocellular carcinoma: a molecular epidemiological approach. *Mutat. Res.* 1999; 428(1): 187–96. [https://doi.org/10.1016/s1383-5742\(99\)00046-0](https://doi.org/10.1016/s1383-5742(99)00046-0)
13. Komaz N.P., Vickos U., Hübschen J.M., Béré A., Manirakiza A., Muller C.P., et al. Cross-sectional study of hepatitis B virus infection in rural communities, Central African Republic. *BMC Infect. Dis.* 2013; 13: 286. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-286>
14. Peto T.J., Mendy M.E., Lowe Y., Webb E.L., Whittle H.C., Hall A.J. Efficacy and effectiveness of infant vaccination against chronic hepatitis B in the Gambia Hepatitis Intervention Study (1986–90) and in the nationwide immunisation program. *BMC Infect. Dis.* 2014; 14: 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-7>
15. Nkrumah B., Owusu M., Aweru P. Hepatitis B and C viral infections among blood donors. A retrospective study from a rural community of Ghana. *BMC Res. Notes*. 2011; 4: 529–32. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-529>
16. Suesstrunk J., Djongali F.B. Hepatitis B virus prevalence in rural areas in south-west Chad. *Trop. Doctor*. 2017; 47(4): 374–7. <https://doi.org/10.1177/0049475517699718>
17. Bernier R.H., Sampliner R., Gerety R., Tabor E., Hamilton F., Nathanson N. Hepatitis B infection in households of chronic carriers of hepatitis B surface antigen: factors associated with prevalence of infection. *Am. J. Epidemiol.* 1982; 116(2): 199–211. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a113406>
18. Shimakawa Y., Bottomley C., Njie R., Mendy M. The association between maternal hepatitis B e antigen status, as a proxy for perinatal transmission, and the risk of hepatitis B antigenaemia in Gambian children. *BMC Public Health*. 2014; 14: 532. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-14-532>
19. Zampino R., Boemio A., Sagnelli C., Alessio L., Adinolfi L.E., Sagnelli E., et al. Hepatitis B virus burden in developing countries. *World J. Gastroenterol.* 2015; 21(42): 11941–53. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i42.11941>
20. Sadoh A.E., Sadoh W.E. Serological markers of hepatitis B e infection in infants presenting for their first immunization. *Niger J. Paediatr.* 2013; 40(3): 248–53. <https://doi.org/10.4314/njp.v40i3.9>
21. Bigna J.J., Amougou M.A., Asangbeh S.L., Kenne A.M., Noumegni S.R.N., Ngo-Malabo E.T., et al. Seroprevalence of hepatitis B virus infection in Cameroon: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*. 2017; 7(6): e015298. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2016-015298>
22. EASL recommendations on treatment of hepatitis C: Final update of the series. *J. Hepatol.* 2020; 73(5): 1170–218. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.08.018>
23. Tognon F., Sevalie S., Gassimu J., Sesay J., Hann K., Sheku M., et al. Seroprevalence of hepatitis B and hepatitis C among blood donors in Sierra Leone: A multi-year retrospective study. *Int. J. Infect. Dis.* 2020; 99: 102–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.07.030>
24. Hønge B.L., Olesen J.S., Jensen M.M., Jespersen S., da Silva Z.J., Rodrigues A., et al. Hepatitis B and C in the adult population of Bissau, Guinea-Bissau: a cross-sectional survey. *Trop. Med. Int. Health*. 2020; 25(2): 255–63. <https://doi.org/10.1111/tmi.13335>
25. Ladep N.G., Lesi O.A., Mark P., Lemoine M., Onyekwere C., Afihene M., et al. Problem of hepatocellular carcinoma in West Africa. *World J. Hepatol.* 2014; 6(11): 783–92. <https://doi.org/10.4254/wjh.v6.i11.783>
26. Flores A., Marrero J.A. Emerging trends in hepatocellular carcinoma: focus on diagnosis and therapeutics. *Clin. Med. Insights. Oncol.* 2014; 8: 71–6. <https://doi.org/10.4137/cmo.s9926>
27. Umoh N.J., Lesi O.A., Mendy M., Bah E., Akano A., Whittle H., et al. Aetiological differences in demographical, clinical and pathological characteristics of hepatocellular carcinoma in the Gambia. *Liver. Int.* 2011; 31(2): 215–21. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2010.02418.x>
28. Kew M.C., Welschinger R., Viana R. Occult hepatitis B virus infection in Southern African blacks with hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2008; 23(9): 1426–30. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2008.05481.x>

REFERENCES

1. WHO. Prevention and control of viral hepatitis infection: frame work for global action 2012. Geneva; 2012.
2. Mukomolov S.L., Levakova I.A. Epidemiological characteristics of chronic viral hepatitis in the Russian Federation in 1999–2009. *Infektsiya i immunitet*. 2011; 1(3): 255–62. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2011-3-255-262>
3. Zabala V., Tong M., Yu R., Ramirez T., Yalcin E.B., Balbo S., et al. Potential contributions of the tobacco nicotine-derived nitrosamine ketone (NNK) in the pathogenesis of steatohepatitis in a chronic plus binge rat model of alcoholic liver disease. *Alcohol Alcohol*. 2015; 50(2): 118–31. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agu083>
4. Yim H.J., Lok A.S. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what we knew in 1981 and what we know in 2005. *Hepatology*. 2006; 43(2 Suppl. 1): S173–81. <https://doi.org/10.1002/hep.20956>
5. Yushchuk N.D., Klimova E.A., Znoyko O.O., Karetkina G.N., Maksimov S.L., Maev I.V. *Viral hepatitis: clinic, diagnosis, treatment [Virusnye gepatity: klinika, diagnostika, lechenie]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2012. (in Russian)
6. Allain J.P., Opare-Sem O. Screening and diagnosis of HBV in low-income and middle-income countries. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2016; 13(11): 643–53. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.138>
7. Ostanikova Yu.V., Semenov A.V., Totolyan A.A. Hepatitis B virus identification in a blood plasma at a low viral load. *Kli-*

- nicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2019; 64(10): 635–40. <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-10-635-640> (in Russian)
8. Semenov A.V., Ostankova Yu.V. Occult (latent) Hepatitis B virus: problems of laboratory diagnostics. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie*. 2019; 8(3): 60–9. <https://doi.org/10.24411/2305-3496-2019-13010> (in Russian)
 9. Morales-Romero J., Vargas G., García-Román R. Occult HBV infection: a faceless enemy in liver cancer development. *Viruses*. 2014; 6(4): 1590–611. <https://doi.org/10.3390/v6041590>
 10. Raimondo G., Locarnini S., Pollicino T., Levrero M., Zoulim F., Lok A.S., et al. Taormina workshop on occult HBV infection faculty members. Update of the statements on biology and clinical impact of occult hepatitis B virus infection. *J. Hepatol*. 2019; 71(2): 397–408. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.03.034>
 11. Shi Y.H., Shi C.H. Molecular characteristics and stages of chronic hepatitis B virus infection. *World J. Gastroenterol*. 2009; 15(25): 3099–105. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.30991>
 12. Sylla A., Diallo M.S., Castegnaró J., Wild C.P. Interactions between hepatitis B virus infection and exposure to aflatoxins in the development of hepatocellular carcinoma: a molecular epidemiological approach. *Mutat. Res*. 1999; 428(1): 187–96. [https://doi.org/10.1016/s1383-5742\(99\)00046-0](https://doi.org/10.1016/s1383-5742(99)00046-0)
 13. Komaz N.P., Vickos U., Hübschen J.M., Béré A., Manirakiza A., Muller C.P., et al. Cross-sectional study of hepatitis B virus infection in rural communities, Central African Republic. *BMC Infect. Dis*. 2013; 13: 286. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-286>
 14. Peto T.J., Mendy M.E., Lowe Y., Webb E.L., Whittle H.C., Hall A.J. Efficacy and effectiveness of infant vaccination against chronic hepatitis B in the Gambia Hepatitis Intervention Study (1986–90) and in the nationwide immunisation program. *BMC Infect. Dis*. 2014; 14: 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-7>
 15. Nkrumah B., Owusu M., Averi P. Hepatitis B and C viral infections among blood donors. A retrospective study from a rural community of Ghana. *BMC Res. Notes*. 2011; 4: 529–32. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-529>
 16. Suesstrunk J., Djongali F.B. Hepatitis B virus prevalence in rural areas in south-west Chad. *Trop. Doctor*. 2017; 47(4): 374–7. <https://doi.org/10.1177/0049475517699718>
 17. Bernier R.H., Sampliner R., Gerety R., Tabor E., Hamilton F., Nathanson N. Hepatitis B infection in households of chronic carriers of hepatitis B surface antigen: factors associated with prevalence of infection. *Am. J. Epidemiol*. 1982; 116(2): 199–211. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a113406>
 18. Shimakawa Y., Bottomley C., Njie R., Mendy M. The association between maternal hepatitis B e antigen status, as a proxy for perinatal transmission, and the risk of hepatitis B e antigenaemia in Gambian children. *BMC Public Health*. 2014; 14: 532. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-14-532>
 19. Zampino R., Boemio A., Sagnelli C., Alessio L., Adinolfi L.E., Sagnelli E., et al. Hepatitis B virus burden in developing countries. *World J. Gastroenterol*. 2015; 21(42): 11941–53. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i42.11941>
 20. Sadoh A.E., Sadoh W.E. Serological markers of hepatitis B infection in infants presenting for their first immunization. *Niger J. Paediatr*. 2013; 40(3): 248–53. <https://doi.org/10.4314/njp.v40i3.9>
 21. Bigna J.J., Amougou M.A., Asangbeh S.L., Kenne A.M., Noumegni S.R.N., Ngo-Malabo E.T., et al. Seroprevalence of hepatitis B virus infection in Cameroon: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*. 2017; 7(6): e015298. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2016-015298>
 22. EASL recommendations on treatment of hepatitis C: Final update of the series. *J. Hepatol*. 2020; 73(5): 1170–218. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.08.018>
 23. Tognon F., Sevalie S., Gassimu J., Sesay J., Hann K., Sheku M., et al. Seroprevalence of hepatitis B and hepatitis C among blood donors in Sierra Leone: A multi-year retrospective study. *Int. J. Infect. Dis*. 2020; 99: 102–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.07.030>
 24. Hønge B.L., Olesen J.S., Jensen M.M., Jespersen S., da Silva Z.J., Rodrigues A., et al. Hepatitis B and C in the adult population of Bissau, Guinea-Bissau: a cross-sectional survey. *Trop. Med. Int. Health*. 2020; 25(2): 255–63. <https://doi.org/10.1111/tmi.13335>
 25. Ladep N.G., Lesi O.A., Mark P., Lemoine M., Onyekwere C., Afihene M., et al. Problem of hepatocellular carcinoma in West Africa. *World J. Hepatol*. 2014; 6(11): 783–92. <https://doi.org/10.4254/wjh.v6.i11.783>
 26. Flores A., Marrero J.A. Emerging trends in hepatocellular carcinoma: focus on diagnosis and therapeutics. *Clin. Med. Insights. Oncol*. 2014; 8: 71–6. <https://doi.org/10.4137/cmo.s9926>
 27. Umoh N.J., Lesi O.A., Mendy M., Bah E., Akano A., Whittle H., et al. Aetiological differences in demographical, clinical and pathological characteristics of hepatocellular carcinoma in The Gambia. *Liver. Int*. 2011; 31(2): 215–21. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2010.02418.x>
 28. Kew M.C., Welschinger R., Viana R. Occult hepatitis B virus infection in Southern African blacks with hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol*. 2008; 23(9): 1426–30. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2008.05481.x>

Информация об авторах

Бумбали Санаба — PhD, зав. аспирантурой НИИ прикладной биологии Гвинеи, Киндия, Гвинейская Республика; директор Международного исследовательского центра по тропическим инфекциям в Гвинеи, Нзерекоре, Гвинейская Республика, <https://orcid.org/0000-0002-4506-6033>

Серикова Елена Николаевна — н.с. лаб. вирусологии и иммунологии ВИЧ-инфекции Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0547-3945>

Семенов Александр Владимирович — д.б.н., зав. лаб. вирусологии и иммунологии ВИЧ-инфекции, зам. директора по инновационной работе Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3223-8219>

Останкова Юлия Владимировна — к.б.н., с.н.с. лаб. молекулярной иммунологии Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия, shenna1@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2270-8897>

Валутите Диана Эдуардовна — врач клинической лабораторной диагностики отд. ВИЧ-инфекции и СПИД-ассоциированных

Information about the authors

Sanaba Boumbaly — PhD, chief, Postgraduate school, Research Institute of Applied Biology, Kindia, Republic of Guinea; director, Centre International de Recherche sur les Infections Tropicales en Guinée, Nzerekore, Republic of Guinea, <https://orcid.org/0000-0002-4506-6033>

Elena N. Serikova — researcher, Laboratory of virology and immunology of HIV infection, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0547-3945>

Aleksandr V. Semenov — D. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of virology and immunology of HIV infection, Deputy director for innovation, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3223-8219>

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

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

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

заболеваний Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0931-102X>

Щемелев Александр Николаевич — м.н.с. лаб. вирусологии и иммунологии ВИЧ-инфекции, аспирант Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3139-3674>

Зуева Елена Борисовна — к.б.н., с.н.с. лаб. экспериментальной вирусологии Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0579-110X>

Терно Амаду Лабэ Балде — сотрудник НИИ прикладной биологии Гвинеи, Киндия, Гвинейская Республика, <https://orcid.org/0000-0002-3808-64380>

Баимова Регина Равилевна — лаборант-исследователь в лаборатории зооантропонозных инфекции Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0145-2653>

Тотоян Арег Артёмович — д.м.н., проф., академик РАН, зав. лаб. молекулярной иммунологии, директор Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4571-8799>

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

Статья поступила в редакцию 18.01.2021;
принята к публикации 18.05.2021;
опубликована 30.06.2021

Aleksandr N. Schemele — junior researcher, Laboratory of virology and immunology of HIV infection, postgraduate student, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3139-3674>

Elena B. Zueva — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of experimental virology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0579-110X>

Thierno A.L. Balde — researcher, Research Institute of Applied Biology, Kindia, Republic of Guinea, <https://orcid.org/0000-0002-3808-64380>

Regina R. Baimova — laboratory assistant researcher, Laboratory of zoonoses, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0145-2653>

Areg A. Totolian — D. Sci. (Med.), Professor, Full Member of RAS, Head, Laboratory of molecular immunology, Director, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4571-8799>

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

The article was submitted 18.01.2021;
accepted for publication 18.05.2021;
published 30.06.2021

ОБЗОРЫ

Научный обзор
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-119>



Клеточный и молекулярный уровень стратегии COVID-19 по индукции иммунодефицита. Возможные терапевтические решения

Бавыкин А.С.

Медицинский институт Тамбовского государственного университета им. Г.П. Державина, Тамбов, Россия

Аннотация

В обзоре рассмотрен характер клинико-патологических нарушений, вызываемых высокопатогенными коронавирусами в организме человека, проведён анализ причин системного поражения различных органов и тканей, стратегии размножения вируса и связанного с этим синдрома цитокиновой реактивности с развитием специфического иммунодефицита на молекулярном уровне. Описаны наиболее сформировавшиеся на сегодняшний день подходы таргетной терапии синдрома цитокиновой реактивности и атипичной пневмонии с элементами тераностики — мониторинга молекулярных мишеней для направленной терапии. Приведён пример инновационной биоинженерной технологии, связанной с перепрограммированием клеток первичного «эшелона обороны» с возможностью надления их высокоспецифическими навыками направленного уничтожения инфицированных вирусом клеток.

Ключевые слова: лимфопения, цитокиновый шторм, тераностика, SARS, перепрограммирование иммунитета

Источник финансирования. Автор заявляет об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Бавыкин А.С. Клеточный и молекулярный уровень стратегии COVID-19 по индукции иммунодефицита. Возможные терапевтические решения. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2021;98(4):450–467.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-119>

Review article
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-119>

Cell and molecular level of strategy of COVID-19 to induce immunodeficiency. Possible therapeutic solutions

Andrey S. Bavykin

Medical Institute of the Tambov State University, Tambov, Russia

Abstract

The review considers the nature of clinical and pathological disorders caused by highly pathogenic coronaviruses in the human body, analyzes the causes of systemic damage to various organs and tissues, the strategy of virus reproduction and the associated syndrome of cytokine reactivity with the development of specific immunodeficiency at the molecular level. The most developed approaches to the targeted therapy of cytokine reactivity syndrome and SARS including elements of theranostics — monitoring of molecular targets for targeted therapy — are described. An example of an innovative bioengineering technology associated with the reprogramming of cells of

the primary "echelon of defense" with the ability to endow them with highly specific skills of directed destruction of cells infected with a virus is given.

Keywords: *lymphopenia, cytokine storm, theranostics, SARS, immune reprogramming*

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: Bavykin A.S. Cell and molecular level of strategy of COVID-19 to induce immunodeficiency. Possible therapeutic solutions. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(4):450–467.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-119>

Введение

Проникновение вируса → первичный контакт → презентация антигена → гуморальный ответ → своевременный вторичный ответ → эффекторные Т-клетки и специфичные антитела В-лимфоцитов — это идеальная последовательность событий развития инфекции, которая, к сожалению, далеко не всегда реализуется иммунитетом пациента на практике.

Промежуток между срабатыванием первичного «эшелона обороны» и формированием иммунокомпетентных клеточных клонов насчитывает многие дни, за которые вирус успевает преодолеть первую линию защиты и распространиться по организму. Для многих пациентов с COVID-19 (4% летальности в среднем по Европе) подобный сценарий развития событий оказывается фатальным [1]. Какие этапы генерализации инфекции являются наиболее критичными, как «укрепить оборону» и на какие молекулярные мишени следует обратить внимание, чтобы подобрать лечение, — вот проблемы, рассматриваемые в представленном обзоре.

В обзоре упор делается на детализацию молекулярных механизмов цитокинового шторма с участием интерферонового каскада (IFN-каскада) и ряда других сигнальных путей, включая MAP-киназный путь и NF-κB-зависимые реакции.

Задача обзора также состоит в том, чтобы разобраться в причинах снижения сопротивляемости организма к вирусу, в том, какие этапы являются наиболее критичными, и почему в ряде случаев иммунная система вдруг начинает «работать против себя».

Собственно, подобное поведение иммунитета представляется краеугольным камнем в выборе стратегий лечения. Они рассматриваются в обзоре именно с точки зрения выявления наиболее критичных мишеней, которые, с одной стороны, могут оказываться главными «виновниками», а с другой — возможно, служат объектами для терапевтического воздействия.

В статье также затронута несколько гипотетическая для респираторных инфекций тема клеточного перепрограммирования, которая в применении к лечению COVID-19 носит, скорее, теоретическое обоснование, однако с заделом на внедрение инно-

вационных подходов, которые при текущей пандемии становятся весьма популярными.

Обзор литературы

Для того чтобы разобраться в том, что происходит на уровне молекулярных механизмов, и в причинах осложнений, обратимся к более ранним исследованиям, посвящённым «знакомствам» человечества с высокопатогенными коронавирусными инфекциями.

Коронавирусные инфекции уже давно путешествуют в человеческой популяции. Первые описания случаев инфекции относят к 1960-м гг. С тех пор, до момента первой вспышки в 2003 г. в Китае, были описаны 4 представителя семейства *Coronaviridae* (HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 и HCoV-NKJ), которые в основном поражают верхние дыхательные пути и, в большей степени, составляют пул так называемых детских инфекций без особых ассоциаций с атипичной пневмонией. Эти вирусы широко распространены по всему миру, включая Россию, и составляют, по разным оценкам, от 2 до 10% ежесезонных острых респираторных вирусных инфекций [2–5].

До вспышки в 2003 г. коронавирусы не доставляли большого беспокойства эпидемиологам и клиническим вирусологам в мире. Однако SARS (Severe acute respiratory syndrome), следующий за ним MERS (Middle East respiratory syndrome) и текущая пандемия SARS-CoV-2, характеризующиеся поражением нижних дыхательных путей, заставили мировую медицинскую общественность говорить о серьёзных и трудно поддающихся решению клинических проблемах — атипичной пневмонии и цитокиновом шторме.

Атипичная пневмония — не новая, но не подробно изученная проблема, особенно с точки зрения маршрутизации большого количества пациентов с гриппоподобными симптомами. Собственно, с осложнений гриппа и появились первые упоминания о молекулярном механизме атипичной пневмонии в середине 1980-х гг. [6]. Особенно актуальным это явление стало в периоды эпидемий «птичьего» и «свиного» гриппа в 2003–2013 гг. Масштабы эпидемии свиного гриппа оказались столь удручающими (по разным оценкам, погибло свыше полумиллиона

человек по всему миру), что ВОЗ была в шаге от объявления пандемии [7].

Цитокиновый шторм тоже был явлением неизвестным и распространённым среди пациентов с ревматоидным артритом [8] или красной волчанкой [9]. Собственно, активно применяемый на сегодняшний день тоцилизумаб (ингибитор интерлейкина-6 — ИЛ-6) как раз пришёл из области лечения пациентов с агрессивными формами этих аутоиммунных заболеваний [10].

С целью понимания природы осложнений, включая цитокиновый шторм, необходимо детально ознакомиться с системными морфологическими изменениями, которые происходят при инфицировании высокопатогенными коронавирусами.

Клинико-патологические изменения при вирусной атипичной пневмонии в лёгких

Среди аутопсийных образцов, взятых от погибших пациентов в разгар эпидемии 2003 г., наблюдалось немало случаев с выраженным диффузным альвеолярным поражением (рис. 1), которое

характеризовалось обширным отёком, коллапсом альвеол, образованием гиалиновой мембраны и наличием фиброзной ткани в альвеолярных пространствах [11–15]. Интенсивность фиброзных разрастаний коррелировала с продолжительностью тяжёлого течения SARS [15]. В тяжёлых случаях также наблюдалась массивная инфильтрация лёгочной ткани моноцитами — макрофагами и лимфоцитами. Почти в половине случаев в инфильтрате было выявлено наличие вирусной РНК (методами *in situ* гибридизации и ПЦР в реальном времени).

Стоит отметить, что более тяжёлые случаи протекания болезни характеризовались существенно пониженным уровнем CD4/CD8-лимфоцитов в сыворотке крови пациентов [15].

Промежуточный вывод. Вирус угнетает специфический иммунный ответ, что подтверждает его особую опасность для людей с исходно пониженным иммунитетом, включая стариков, онкологических больных и лиц, страдающих хроническими заболеваниями.

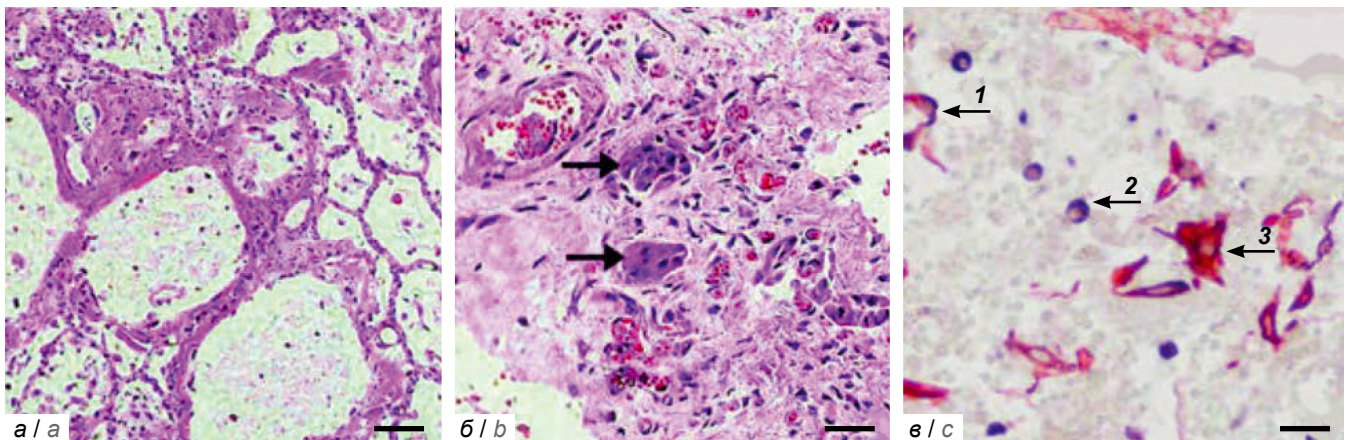


Рис. 1. SARS-индуцированные патологические изменения в аутопсийных образцах лёгочной ткани (рисунок заимствован из публикации J. Gu и соавт. [15] в соответствии с разрешениями издателя).

а — SARS вызвал серьёзное повреждение, образование гиалиновой мембраны, отёк, экссудацию фибрина и некоторые воспалительные клетки (окрашивание гематоксилином и эозином). Образец от 50-летнего пациента с атипичной пневмонией, который умер через 33 сут после начала заболевания;

б — многоядерные клетки (стрелки) в лёгких пациента с SARS (окрашивание гематоксилином и эозином). Образец от 51-летнего пациента SARS, умершего на 45-е сутки;

в — ткань лёгкого от 58-летнего пациента после 58 сут болезни. Двойное мечение, объединяющее гибридизацию *in situ* вирусной геномной последовательности SARS и иммуногистохимию с антителами к цитокератину (AE1/AE3); видны два коричневатокрасных (цитокератин) и фиолетово-синих сигнала вирусного генома в тех же клетках, идентифицирующие инфицированные клетки как пневмоциты (стрелка 1). Стрелка 2 указывает на клетку, инфицированную вирусом SARS (положительная окраска, пурпурный цвет, метод *in situ* гибридизации). Стрелка 3 указывает на пневмоцит, отрицательный при гибридизации *in situ* (только цитокератин-положительный, коричневатокрасный сигнал), который не инфицирован вирусом SARS.

Fig. 1. SARS-induced pathology in autopsy lung samples (photo obtained from publication of J. Gu *et al.* [15] in accordance with publisher's permission guidelines).

а — SARS caused severe damage, hyaline membrane formation, edema, fibrin exudation, and some inflammatory cells (hematoxylin and eosin stain). Sample from a 50-year-old male SARS patient who died 33 days after disease onset;

б — multinucleated cells (arrows) in the lungs of a SARS patient (hematoxylin and eosin stain). Sample from a 51-year-old male SARS patient who died on day 45;

в — sample from a 58-year-old male patient with SARS who died 58 days after disease onset. Double labeling combining *in situ* hybridization (ISH) of SARS viral genomic sequence and IHC with antibodies to cytokeratin (AE1/AE3) showing both brownish red (cytokeratin) and purplish blue signals for viral genome in the same cells, identifying the infected cells as pneumocytes (arrow 1). Arrow 2 points to an ISH-positive cell (purplish blue signal), representing an inflammatory cell that is infected by SARS virus. Arrow 3 points to an *in situ* hybridization-negative pneumocyte (cytokeratin-positive, brownish red signal only) that is not infected by SARS virus.

Патологические изменения в других органах и системах при атипичной пневмонии

В отличие от своих малопатогенных «собратьев», высокопатогенные коронавирусы, по сути, оказывают системное негативное влияние на весь организм. Почему так происходит — на этот вопрос во многом отвечает механизм проникновения вируса в клетку.

Механизм проникновения вируса в клетку

Наиболее критичным этапом для проникновения вируса в клетку служит механизм взаимодействия оболочечного S-белка с рецепторно-фуриновым комплексом на поверхности клетки-мишени. Вирус распознает и специфически связывается с рецептором к ангиотензину 2 (ACE2), однако одного этого контакта недостаточно для проникновения вируса в клетку. В дополнение к распознаванию вирусу требуется пройти своеобразную систему дополнительного контроля.

Этот контроль осуществляет особый класс трансмембранных фуриноподобных сериновых протеаз, в частности TMPRSS2. Она осуществляет дополнительное распознавание S2-фрагмента шипика оболочки вируса, что даёт «добро» на прохождение вируса внутрь (подробности см. на **рис. 2**).

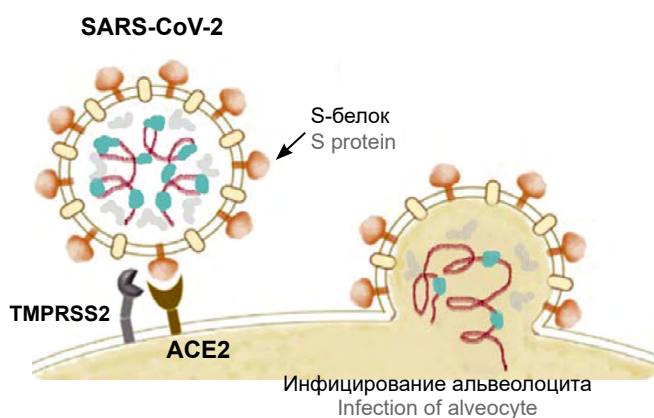


Рис. 2. Осуществление пропускной функции TMPRSS2 на поверхности клеточной мембраны альвеолоцита.

При инфицировании происходит как бы двойной досмотр. После взаимодействия с рецептором ACE2 для пропуски внутрь (слияние мембран) дополнительно требуется участие фуриноподобной протеазы TMPRSS2, которая «откусывает» фрагмент шипика, делая его контакт с ACE2 активным, и пропускает вирус внутрь клетки.

Fig. 2. Throughput function of TMPRSS2 on the alveocyte membrane surface.

The initial step of infection resembles a double control at the border pass. When the virus in order to pass inside cell (membrane fusion) enters the booth (ACE2) and shows its passport (S-protein), a visa is required (presence of PRRARSV-motif for spike-protein). If the «visa» is ok, then the «border guard» (furin-like protease TMPRSS2) cuts off its fragment (proteolytic cleavage), resulting in S-protein activation and allows virus to go through.

Тропность вирусных антигенов к различным органам и тканям

Учитывая широкую представленность рецептора к ACE2 в различных органах и тканях, было бы не совсем точным рассматривать высокопатогенную коронавирусную инфекцию человека исключительно с точки зрения поражения лёгочной системы.

По результатам исследования экспрессии ACE2 у пациентов с COVID-19 была составлена карта распределения данного рецептора по организму (**рис. 3**) [16].

Клинико-морфологические характеристики поражённых органов при SARS и MERS

Данные анализа тесно коррелируют с клиническими исследованиями репликации SARS-CoV-1 в тканях и органах пациентов:

- респираторный тракт — диффузное поражение альвеол различной степени остроты. Экссудативные признаки, включая отёк и формирование гиалиновых мембран, фиброз, макрофагальную или смешанную клеточную инфильтрацию, многоядерные гигантские клетки, атипичные реактивные пневмоциты и повреждение сосудов [17–21];
- кишечник — поражение лимфоидной ткани слизистой оболочки [17, 22];
- почки — острый некроз канальцев [23, 24];
- ЦНС — отёк и дегенерация нейронов [17, 19];
- скелетная мускулатура — некроз и атрофия мышечных волокон [17, 22, 24];
- надпочечники — некроз и лимфоцитарно-моноцитарная инфильтрация [17, 19];
- щитовидная железа — разрушение фолликулярных клеток, апоптоз в единичных клетках [25];
- яички — апоптоз и разрушение сперматоцитов [26, 27];
- сердце — отёк и атрофия волокон миокарда [17, 19].

Сходные морфопатологические изменения были описаны в отношении пациентов, инфицированных MERS во время вспышек в 2012–2015 гг. В результате исследования аутопсийного материала были выявлены очаговые поражения лёгочной ткани, включая плевральные, перикардиальные и абдоминальные выпоты, параллельно с генерализованным застоем и отёком лёгких [27]. Кроме того, были отмечены некроз эпителиальных клеток, слушивание бронхиолярного эпителия, альвеолярный отёк и утолщение альвеолярных перегородок. Иммуногистохимическое исследование показало, что MERS-CoV инфицировал преимущественно дыхательные пути и альвеолярные эпителиальные клетки, а также эндотелиальные клетки и макрофаги. Тяжесть поражения лёгких коррелировала с обширной инфильтрацией нейтрофилами и макрофагами [28].

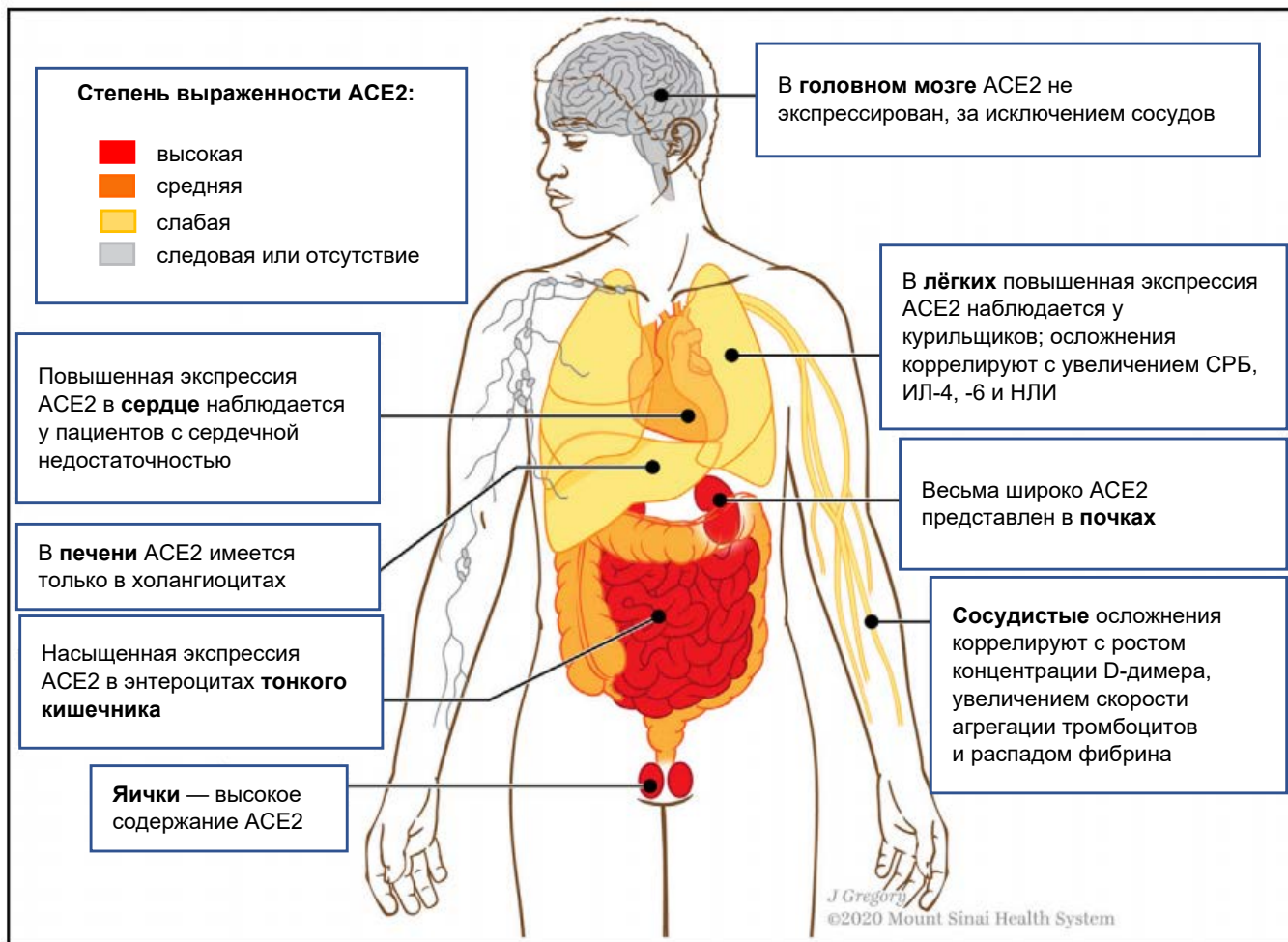


Рис. 3. Клинико-патологическое картирование ACE2 по организму (рисунок заимствован из публикации N. Vabret и соавт. [16] и адаптирован в соответствии с разрешением издателя).

ИЛ — интерлейкины; СРБ — С-реактивный белок; НЛИ — нейтрофильно-лимфоцитарная инфильтрация.

Fig. 3. Clinical and pathological mapping of ACE-2 throughout the body (figure is obtained from the article of N. Vabret *et al.* [16] in accordance with publisher's permission guidelines).

URL: [https://www.cell.com/immunity/pdf/S1074-7613\(20\)30183-7.pdf](https://www.cell.com/immunity/pdf/S1074-7613(20)30183-7.pdf)

The grey → yellow → red colors demonstrate the degrees of ACE2 expression in the body organs.

Промежуточные выводы:

- при SARS имеет место неоднородное поражение различных органов и тканей с преимущественным размножением вируса в иммунных клетках и эпителии;
- неоднородность инфицирования, возможно, зависит от различной представленности комбинаций ACE2 с сериновыми протеазами на поверхности разных типов тканей;
- репликация вируса в клетках-мишенях нередко приводит к их апоптозу.

Взаимосвязь вирус-индуцированного гуморального и клеточного иммунитета с клинико-патологическими изменениями при COVID-19

История взаимодействия вирусов с человеком уходит глубоко в века, поэтому в процессе эволюции человека его клетками был выработан целый

набор механизмов борьбы с инфекциями и ответа на разные их типы не только на основании распознавания структуры поверхностных антигенов, но и путём взаимодействия с определённым типом генетического материала вирусов.

К этим молекулярным механизмам относится семейство Toll-подобных рецепторов (Toll-like receptors — TLRs). Они могут не только отличить ДНК (TLR9) от РНК, но и распознать тип РНК вируса [29]: с одной цепью РНК (TLR7, TLR8) или с двумя (TLR3). Эти рецепторы также известны под общим названием «рецепторы распознавания паттерна/образа».

При «встрече» с коронавирусами (здесь и далее речь пойдёт о SARS-CoV-1, -2 и MERS) рецепторы TLR активируют IFN-каскады, которые, в свою очередь, запускают первый эшелон защиты на уровне гуморального ответа с последующим подключением механизмов специфического иммунитета. Общая

иллюстрация реакции иммунитета на COVID-19 показана на **рис. 4**. Усиление экспрессии ИЛ-6 и ФНО- α привлечёнными в очаг воспалительными моноцитами и SARS-инфицированными клетками в совокупности подавляет активность NK-клеток. ИЛ-6, -1 β и IFN-I/III из инфицированного лёгочного эпителия могут вызывать воспалительные ответы резидентных макрофагов, воспалительных моноцитов, а также гранулоцитов и лимфоцитов из местного кровотока. ИЛ-6 и ФНО- α вместе с прибывшими моноцитами могут управлять несколькими каскадами гипервоспаления. Воспалительные макрофаги, происходящие из моноцитов, могут по-разному усиливать дисфункциональные реакции. Системный реактивный цитокиновый синдром может вызвать нейтрофильный нетоз (апоптоз нейтрофилов) и микротромбоз, что серьёзно обостряет течение COVID-19. Другие миелоидные клетки, такие как дендритные клетки, предположительно, осуществляют IFN-зависимую роль в вирусном контроле. Хемокиновый лиганд CXCL9 из моноцитов привлекает из крови NK-клетки. Предварительные данные

свидетельствуют о том, что противовирусная функция NK-клеток может регулироваться перекрёстными взаимодействиями с SARS-CoV-2-инфицированными клетками и воспалительными моноцитами.

Вслед за активацией IFN-каскада инфицированными клетками осуществляется выброс провоспалительных медиаторов (включая ИЛ-6, -8 и ФНО- α), а также хемокинов, которые привлекают в очаг поражения нейтрофилы и макрофаги, повышают уровень С-реактивного белка. У пациентов с более тяжёлыми формами протекания болезни наблюдается повышенная концентрация хемокинов класса CXCL 9–11 и CCL 2, 7, 12, что ассоциируется с избыточным воспалением, повышенным пирогенным эффектом, отёком и рядом других проявлений, которые в совокупности составляют основу цитокинового шторма.

IFN-I может усиливать экспрессию ACE2, что делает клетки более восприимчивыми к вирусу, который в них реплицируется с последующей реинфекцией [30].

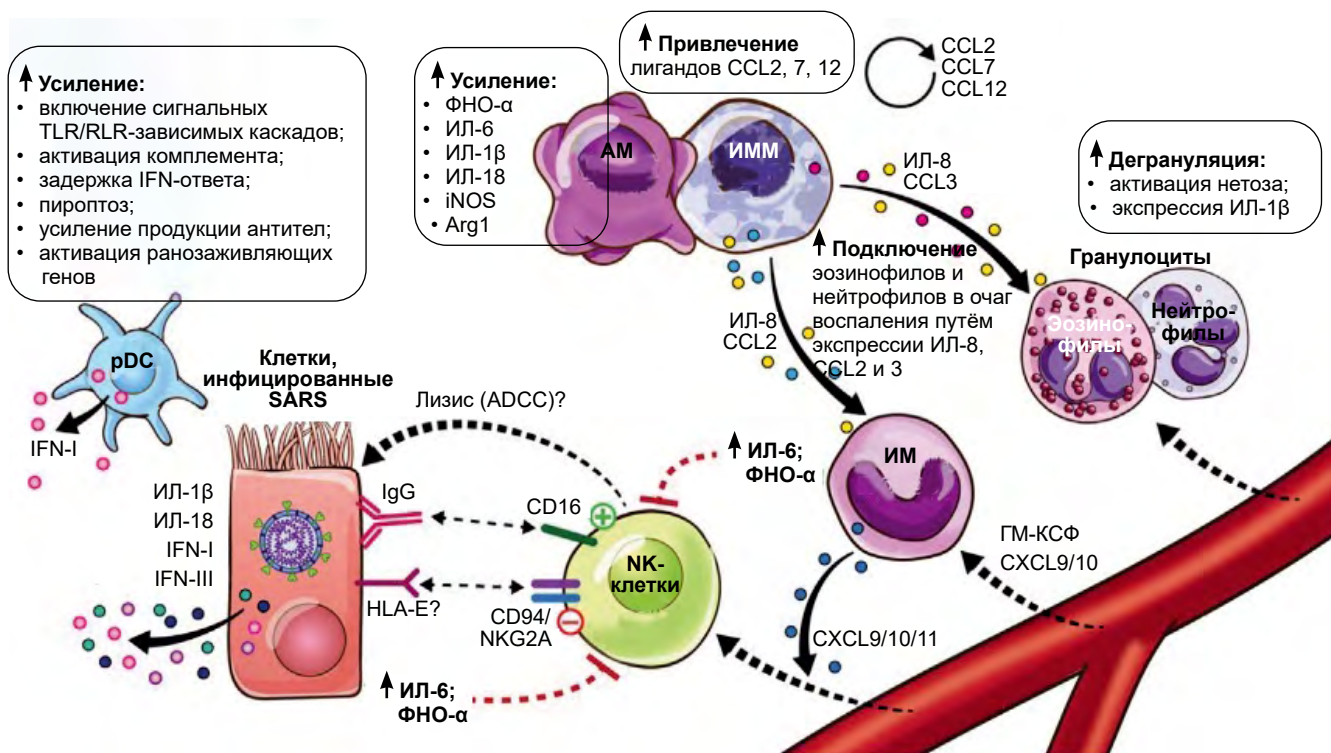


Рис. 4. Местная реакция в лёгких на COVID-19 (рисунок заимствован из работы N. Vabret и соавт. [16] и адаптирован в соответствии с разрешением издателя).

IFN — интерферон; IgG — иммуноглобулины типа G; ФНО- α — фактор некроза опухоли- α ; CD94/NKG2A — лектиновые рецепторы типа C, экспрессируются преимущественно натуральными киллерами (NK-клетки); CXCL9/10/11 — семейство хемокиновых рецепторов, обладающих общим C-X-C мотивом; CCL2, 7, 12 — семейства хемокиновых лигандов; TLR/RLR — Toll- и RIG-подобные рецепторы; iNOS — индуцируемая NO-синтаза; Arg1 — аргиназа 1-го типа; ГМ-КФ — гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; AM — альтернативно активированные макрофаги; IMM — воспалительные клетки макрофагально-моноцитарного ряда; ИМ — воспалительные моноциты; pDC — плазмацитоидные дендритные клетки; Arg1 — аргиназа 1; iNOS — индуцированная синтаза оксида азота. Пунктирными линиями обозначены пути, требующие подтверждения.

Fig. 4. Local immune response in COVID-19 (figure is obtained from the article of N. Vabret *et al.* [16] in accordance with publisher's permission guidelines). URL: [https://www.cell.com/immunity/pdf/S1074-7613\(20\)30183-7.pdf](https://www.cell.com/immunity/pdf/S1074-7613(20)30183-7.pdf)

В 1-е сутки очаг воспаления и вирусного поражения наполняется несколькими клеточными популяциями, включая антигенпрезентирующие дендритные клетки, NK-клетки, вируснейтрализующие макрофаги и нейтрофилы.

Секреция ФНО- α потенцирует активацию NF- κ B-сигналинга, играющего ключевую роль в поддержании пролифераций действующих клеточных популяций, присутствующих в очаге (механизм действия NF- κ B показан на **рис. 5**).

Стоит отметить ряд работ, в которых было показано, что вирусные белки активно интерферируют со многими вышеописанными процессами: подавляют синтез IFN-I (исследования [32–35] выявили супрессию секреции IFN белками SARS-CoV-1 *in vitro* и *in vivo*); в то время как при сложных случаях высокопатогенных коронавирусных инфекций уровень IFN в крови был значительно ниже по сравнению с «лёгкими» больными [36], подробности указаны на **рис. 6**.

Промежуточный вывод. С одной стороны, белки коронавируса ослабляют противовирусный иммунитет, с другой — пролонгируют присутствие хемокинсекретирующих клеток гуморального иммунитета в очаге поражения. Подобные звенья становятся ключевыми этапами формирования цитокинового шторма.

Гиперфункция иммунных клеток

Очередным событием, приводящим к драматическим нарушениям гомеостаза при коронавирусных инфекциях, становится насыщение зон вирусной инвазии избыточными популяциями клеток гуморального иммунитета.

В большей степени это касается моноцитарно-макрофагальной популяции, а также Т-клеток. Иммунная система буквально «сходит с ума», и вместо того, чтобы захватывать и разрушать вирус, клетки принимаются синтезировать медиаторы воспаления, направленные исключительно на увеличение присутствия определённых типов клеток (макрофагов и нейтрофилов, см. **рис. 4**) в очаге воспаления. В результате, с одной стороны, усугубляются повреждения органной структуры (альвеолярные стенки с замещением соединительной тканью и аналогичные процессы фиброза в почках и сердце). С другой стороны, активно размножающиеся клетки служат удачными компартаментами для дополнительной репликации в них вируса.

На моделях *in vivo* были получены убедительные доказательства того смещения экспрессионного паттерна макрофагов на уровне подавления белками коронавируса IFN-каскада с последующей инактивацией противовирусного митоген-ассоциированного протеинкиназного сигналинга и компенсаторным усилением ФНО- α \rightarrow NF- κ B \rightarrow CCL2 и IL-6, IL-8 секреции. Хемокиновые лиганды (CCL2)

привлекают в очаг дополнительные провоспалительные макрофаги [37, 38]. В результате избыточной лизосомальной активности наблюдаются выраженные повреждения бронхоальвеолярного дерева с развитием классических форм острого респираторного дистресс-синдрома, что нередко приводит к летальным исходам.

Индукция апоптоза в инфицированных клетках

Индукцией апоптоза объясняется в равной степени как повреждающий эффект коронавирусов в отношении эпителиоцитов (например, в лёгких и почках), так и рестрикция специфического иммунитета, когда у тяжёлых пациентов значительно уменьшается содержание эффекторных Т-клеток.

Дело в том, что в любой клетке имеется баланс между положительными и негативными регуляторами жизненного цикла. К числу антагонистов относятся несколько семейств белков, вовлечённых в апоптоз. Эти белки взаимосвязаны посредническими сигнальными молекулами и работают на нескольких уровнях клеточной организации, таких как индукция оксидативного стресса в митохондриях (семейство BCL2), регуляция жизненного цикла, фрагментация ДНК при участии каспаз. Каспазный каскад, в свою очередь, также регулируется ингибиторами апоптоза (cIAP-2, -3, Birc 5, 7, FLIP). Белки этого семейства блокируют апоптоз на уровне вступления клетки в G1-фазу деления [39].

На сегодняшний день остаётся неясным, по какому принципу происходит выбор вирусной апоптотической индукции той или иной популяции клеток, однако в крови пациентов, инфицированных SARS-CoV-2, уже на 1-е сутки от развития симптомов наблюдался повышенный уровень транскрипционного фактора FOXO3A [40], который известен как антагонист ингибитора апоптоза FLIP [41], блокирующий передачу нисходящих сигналов от активированного проапоптотического Fas-лиганда. Также на моделях *in vitro* была показана прямая зависимость между проапоптотической активацией каспаз-9, -3 и -8 и размножением SARS-CoV-2 в инфицированных клетках [6].

Рестрикция специфического противовирусного иммунитета

Помимо синдрома цитокиновой реактивности и острого респираторного дистресс-синдрома у пациентов с тяжёлыми формами коронавирусных инфекций наблюдаются выраженная лимфопения и негативный сдвиг в сторону снижения CD8- и CD4-популяций Т-клеток. Точный механизм остаётся пока на уровне предположений.

По одной версии, это вышеупомянутый NF- κ B-индуцированный апоптоз [42]. По другой версии, лимфопения может быть вызвана формированием аномального фенотипа эффекторных

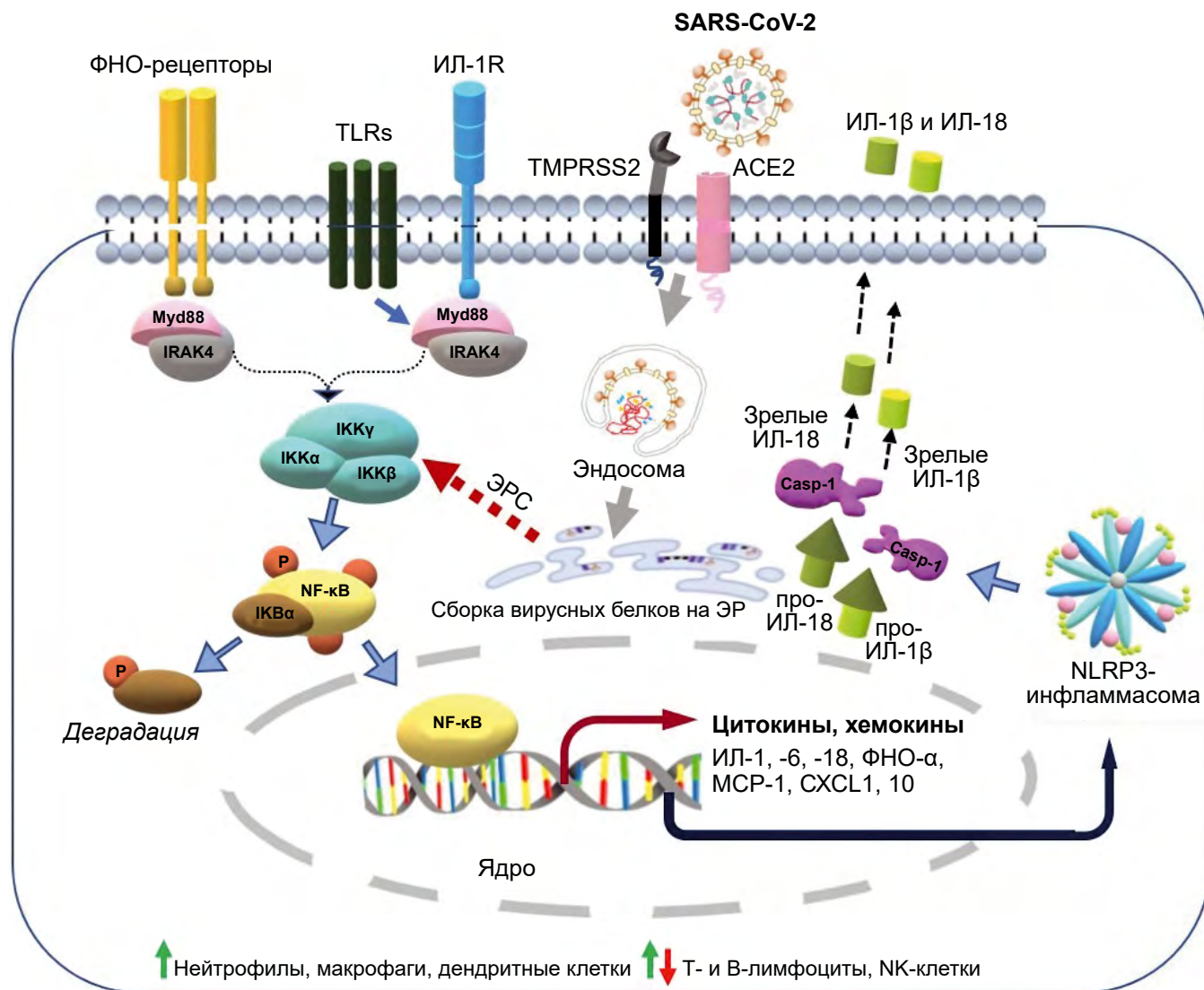


Рис. 5. Схема роли NF-κB в воспалительном процессе.

В условиях инфицированности SARS-CoV-2 клеток гуморального иммунитета гиперактивированный сигналинг «IKK — NF-κB» превращается в своеобразный воспалительный *perpetuum mobile*. Поступающие сигналы от ИЛ-1R, TLR и ФНО-рецепторов при посредничестве адапторных молекул Myd88/IRAK4 активируют киназный ИКВ α -комплекс (состоящий из α -, β -, γ -субъединиц ИКК), что приводит к диссоциации ингибирующей субъединицы ИКВ α (с её последующей деградацией) и димера p50/p65 (NF-κB), который мигрирует в ядро и выполняет роль транскрипционного фактора для интенсивного синтеза цитокинов, хемокинов и адгезивных молекул. Затем хемокины «приглашают в гости» дополнительные клетки нейтрофильного ряда из кровоснабжающего бассейна, и всё начинается заново. В результате в поражённых тканях и плазме пациента накапливается чудовищная концентрация воспалительных медиаторов, которые вызывают структурные повреждения лёгких и других органов, а также разрушение самих инфицированных нейтрофилов (нетоз), что, в частности, в местном кровотоке нередко приводит к тромбоагрегации и осложнениям в виде инсультов. «Масла в огонь» (дополнительная активация ИКВ α) также «подливают» сами вирусы, сборка белков которых на эндоплазматическом ретикулуме вызывает эндоплазматический стресс (ЭРС). Цитокиновый шторм усугубляется секрецией драйверных цитокинов воспаления ИЛ-18 и -1 β посредством включения инфламмосомы (NLRP3) — «моторчика», отвечающего за процессинг предшественников данных молекул при помощи каспазы-1; NLRP3 в настоящее время рассматривается в качестве терапевтической мишени.

Красные и зелёные стрелки обозначают агонистическое и антагонистическое влияние NF-κB на соответствующие популяции клеток [31].

Fig. 5. Illustration of NF-κB role in inflammation.

During SARS-CoV-2 infection in humoral immunity cells, hyper activated IKK — NF-κB signaling turns to act as *perpetuum mobile*. Upcoming signals from IL-1R, TLR and TNF-receptors in assistance with adaptor kinases Myd88/IRAK4 activate IKK α -protein complex (consisting of 3 subunits IKK α , β , γ), that results in dissociation of inhibitory IKB α (with its subsequent degradation) and dimer proteins p50/p65 (NF-κB), which are transported to nucleus in order to act as transcription factor for intensive production of cytokines, chemokines, and adhesive molecules. Chemokines in turn attract additional cells of neutrophil subpopulations from local vessels and all process goes in cycle. Finally affected tissue accumulate tremendous concentration of inflammation mediators that in addition to structural lesions in lungs and other organs cause death of infected neutrophils (netosis) in blood vessels, followed platelet aggregation and frequent insults as complications. “Fuel to the flame” adds IKB α , activated by viral protein assembly on endoplasmic reticulum (ER) and ER stress. Severity of cytokine release syndrome is enhanced by secretion of inflammatory driver cytokines IL-18 and IL-1 β , through the activation of inflammasome (NLRP3), a kind of “motor” responsible for processing of the precursors of these molecules using caspase-1 (casp-1); NLRP3 is currently being considered as a therapeutic target. Red and green arrows indicate agonistic and antagonistic effects of NF-κB on the corresponding cell populations [31].

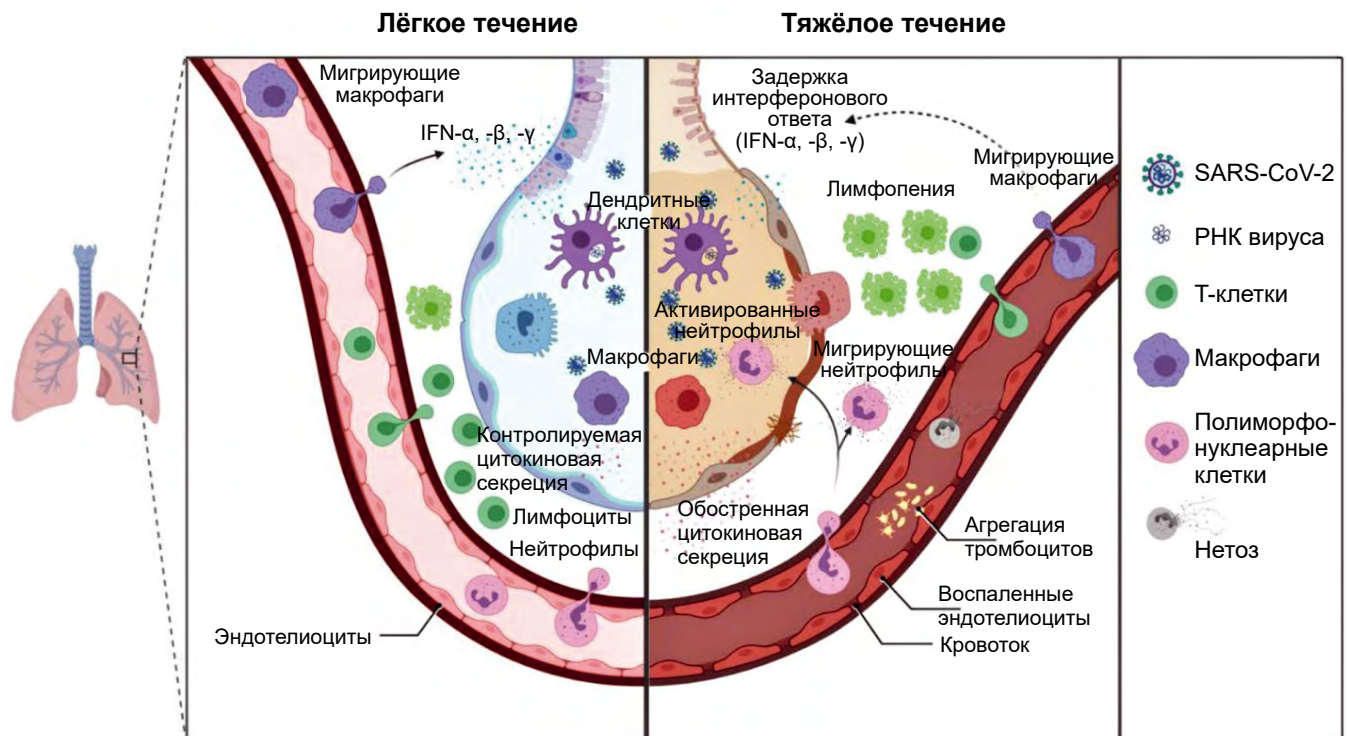


Рис. 6. Сопоставление патогенеза при лёгком и тяжёлом течении коронавирусных инфекций на модели альвеолярного микроокружения (рисунок заимствован из публикации G. Lebeau и соавт. [36] и адаптирован в соответствии с правилами издателя).

При осложнённом варианте наблюдаются выраженная лимфопения, значительное подавление секреции IFN, поражение альвеолярного эпителия, усиленная секреция цитокинов макрофагами, инфильтрация нейтрофилами лёгочной ткани, сопровождающаяся их апоптозом (нетоз) в сосудах и тромбоцитарной агрегацией. При этом избыточные количества ИЛ-6 и ИЛ-8 усиливают стимуляцию экспрессии NF- κ B.

Fig. 6. Comparison of pathogenesis in mild and severe SARS infection on the model of alveolar microenvironment (figure is obtained from the article of G. Lebeau *et al.* [36] in accordance with publisher's permission rules). URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7460647>

субпопуляций Т-клеток. Так, в ходе изучения изменения фенотипического профиля Т-лимфоцитов в динамике от стадии первичных симптомов до стадии ухудшения разными группами исследователей отмечено, что наравне с негативным сдвигом CD8, CD137, OX40 и CD28⁺ нарастали субпопуляции, экспрессирующие ингибиторы контрольных точек, такие как TIM-3, PD-1⁺ и CTLA-4⁺ [43]. Т-клеточные ингибиторы контрольных точек негативно регулируют Т-клеточную пролиферацию и при взаимодействии с собственными лигандами могут вызывать гибель Т-хелперов.

Согласно многочисленным наблюдениям [36, 43, 44], иммунологическая картина при высокопатогенных коронавирусных инфекциях складывается таким образом, что у пациентов с лёгким течением или выздоравливающих уровень Т-клеток нормальный или слегка повышенный, в то время как у тяжёлых больных, главным образом получавших интенсивную терапию, содержание Т-клеток в крови значительно снижено. Одновременно их сниженное количество коррелирует с повышенными показателями ИЛ-6, -10 и ФНО- α .

Промежуточные выводы. Повреждающий эффект при остром респираторном дистресс-синдроме может быть вызван по крайней мере двумя отдельными или пересекающимися событиями:

- а) формированием цитотоксических популяций макрофагов и Т-клеток;
- б) COVID-19-индуцированным апоптозом эпителиоцитов. Это, возможно, объясняет причины септических поражений у тяжёлых «ковидных» пациентов.

Инновационные подходы для лечения высокопатогенных коронавирусных инфекций

Наравне с использованием классической медицины эпоха терапии COVID-19 знаменуется небывало широким внедрением всевозможных высокотехнологичных разработок, включая биоинженерные препараты и вакцины, а также таргетную терапию. В этом смысле большой интерес могут представлять молекулярные «мишени», играющие ключевые роли в патогенных звеньях: их можно не только выявлять, но и целенаправленно блокировать.

На фоне поистине громадных человеческих потерь в мире от SARS-CoV-2 инфекции (на сегодняшний день свыше 3 млн летальных исходов)¹ может создаться впечатление о беспомощности фармакологической системы. Однако стоит учитывать, что большинство инфицированных всё же выживают, причём у значительной части из них (25–50%) болезнь протекает легко или почти бессимптомно².

Таким образом, без учёта каких-либо лекарственных средств, самым главным инструментом борьбы с вирусом является наш иммунитет. Поистине он готов на великие свершения, порой даже с перебором, о чём свидетельствует тот же цитокиновый шторм. Задача только в том, чтобы «снять ему с глаз повязку» и направить всю мощь иммунитета в нужное русло. Возможными оптимальными решениями (не исключая базовой противовирусной терапии) представляются тераностические подходы, при которых определяемые патогномоничные факторы одновременно являются объектами для терапии, а также программирование первичного иммунитета.

Тераностика цитокинового шторма

Ингибирование интерлейкина-6

Одной из первых подсказка пришла из таргетной терапии аутоиммунных заболеваний, включая красную волчанку [45] и ревматоидный артрит [8], — типичных примеров, при которых организм «грызёт самого себя», где использовался ингибитор ИЛ-6 (рис. 7) — препарат тоцилизумаб.

Заранее сложно предсказать, на каком этапе возникает необходимость терапии тоцилизумабом, поэтому в настоящее время активно предлагаются схемы мониторинга маркёров цитокинового шторма в плазме крови [46].

В США Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов объявило о выдаче разрешения на экстренное использование иммуноанализа ИЛ-6 для пациентов с COVID-19³. Анализ используется для определения тяжёлой воспалительной реакции у пациентов с подтверждённым заболеванием COVID-19, чтобы помочь в определении риска интубации с использованием искусственной вентиляции лёгких в сочетании с клиническими данными и результатами других лабораторных исследований.

В клиническом руководстве, опубликованном 04.03.2020 Национальной комиссией здравоохранения Китая по диагностике и лечению пневмонии

COVID-19 (7-е издание), ИЛ-6 рассматривается в качестве объекта анализов⁴.

Итальянское общество инфекционных и тропических болезней в Руководстве по уходу за людьми с заболеванием COVID-19, издание 2.0⁵, упоминает, что ИЛ-6 является центральным медиатором токсичности синдрома высвобождения цитокинов, а определение уровня ИЛ-6 может помочь выявить наиболее серьёзных пациентов с COVID-19.

Ингибирование фактора некроза опухоли-α

Подобно тоцилизумабу, ингибиторы ФНО-α применяются для лечения аутоиммунных патологий, включая болезнь Крона и ревматоидный артрит, в частности, на основе мониторинга уровня ФНО в плазме крови пациентов [47].

Из отчёта врачей Глобального ревматологического альянса [48], посвящённого лечению пациентов с ревматическими заболеваниями, госпитализированных с COVID-19, следует, что применение анти-ФНО-ингибиторов может коррелировать с уменьшением вероятности госпитализации.

В настоящее время в разных точках мира инициировано несколько клинических испытаний по применению анти-ФНО-блокаторов.

Так, учёные из Оксфорда планируют провести исследование у пациентов, находящихся в стационаре, чтобы оценить, снижает ли лечение адалимумабом прогрессирование до тяжёлой или критической фазы заболевания или смерти у пациентов с COVID-19 [49].

В то же время группа клиницистов из Национального Института Здоровья (США) проводит набор во II фазу клинических испытаний другого анти-ФНО-препарата — инфликсимаба⁶. Согласно их гипотезе, раннее начало терапии ингибиторами ФНО-α у пациентов с тяжёлыми инфекциями COVID-19 предотвратит дальнейшее клиническое ухудшение и раннюю смертность, а также снизит потребность в расширенной кардиореспираторной поддержке.

Ингибирование JAK

Белки JAK участвуют в передаче сигналов JAK/STAT, связанных с большим числом цитокиновых рецепторов. В частности, провоспалительный путь с участием ИЛ-6/STAT-3 активируется преи-

¹ Данные научного центра Джона Хопкинса.
URL: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>

² Данные центра контроля болезней США, CDC.
URL: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/planning-scenarios.html>

³ Access IL-6 – Beckman Coulter, Inc. // Fact sheet for healthcare providers. October 1, 2020.
URL: <https://www.fda.gov/media/142598/download>

⁴ Chinese clinical guidance for COVID-19 pneumonia diagnosis and treatment. 7th edition.
URL: <http://kjfy.meetingchina.org/msite/news/show/cn/3337.html>

⁵ Guidelines for the treatment of people with COVI-19 disease. Edition 2.0, 13 March 2020.
URL: <https://www.acep.org/globalassets/images/italian-guidelines-for-covid-19-google-translate.pdf>

⁶ ClinicalTrials.gov. NCT04425538. A Phase 2 Trial of Infliximab in Coronavirus Disease 2019 (COVID-19).
URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04425538>

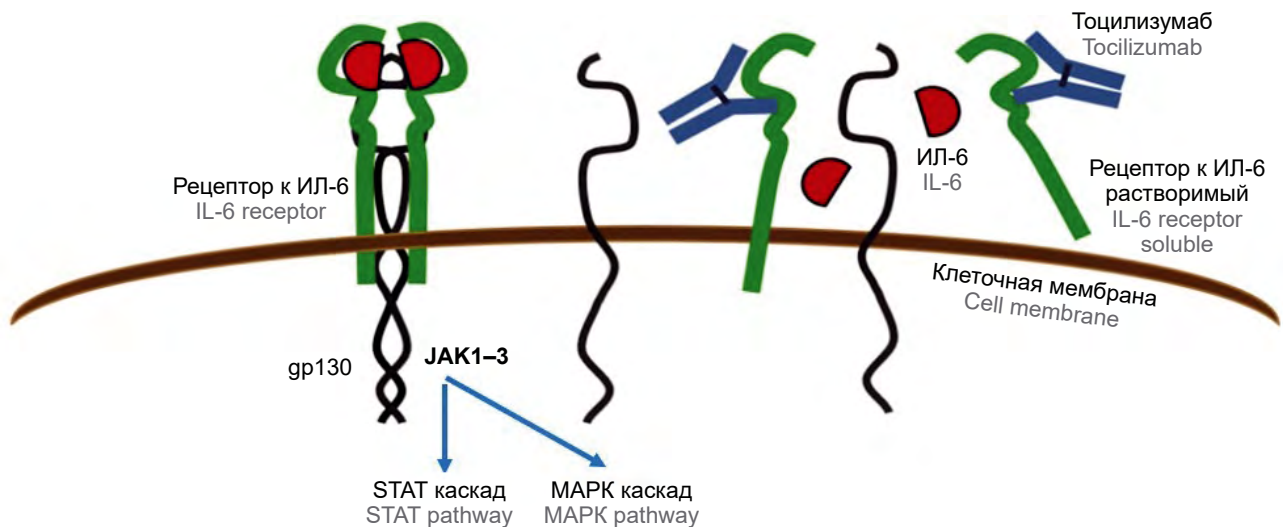


Рис. 7. Блокировка сигналинга ИЛ-6.

ИЛ-6 связывается и образует комплекс с рецептором ИЛ-6 и гликопротеином 130 (gp130), что приводит к гомодимеризации gp130 и последующей активации сигнальной системы. Тоцилизумаб нацелен как на растворимые, так и на мембранно-связанные рецепторы ИЛ-6, тем самым ингибируя связывание ИЛ-6 с обоими рецепторами и активируя JAK-STAT-MAP-киназный воспалительный каскад. JAK — Янус-активированная киназа; STAT — преобразователь сигналов и активатор транскрипции; MAPK — митогенактивируемые протеинкиназы.

Fig. 7. Interleukin-6 (IL-6) pathway blocking.

IL-6 binds and forms a complex with IL-6 receptor and glycoprotein 130 (gp130), that leads to homodimerization of gp130 and subsequent activation of the signaling system. Tocilizumab targets both soluble and membrane-bound IL-6 receptors, thereby inhibiting IL-6 binding to both receptors and activating the JAK-STAT-MAP-kinase inflammatory cascade.

JAK — Janus-activated kinase; STAT — signal transducer and transcription activator; MAPK — mitogen-activated protein kinases.

мущественно при злокачественных опухолях и различных инфекциях [50, 51]. Ингибиторы JAK хорошо известны и одобрены во многих странах при лечении ревматических заболеваний, миелофиброза и язвенного колита [52].

Эти препараты вполне могут быть рассмотрены для терапии COVID-19, поскольку механизм их действия вполне вписывается в патогенез синдрома цитокиновой реактивности. Например, использование барицитиниба и упадацитиниба при ревматоидном артрите существенно снижало уровень ИЛ-6 и нагрузку на сердце [53]. Также имеются данные по корреляции активности JAK/STAT-сигналинга с уровнем ИЛ-6 в плазме [54].

Подавление NF-κB-связанных сигнальных путей

После разработки тоцилизумаба изыскание таргетных средств для купирования NF-κB-сигналинга в роли ключевого драйвера воспаления становится чрезвычайно популярным в современной фармакологии синдромов COVID-19.

Выделяют несколько уровней ингибирования:

- блокировка деградации ИКВ α -комплекса (ингибиторы тирозинкиназы Брутона);
- ингибирование внутриядерного транспорта и ДНК-связывающего процесса (рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами);
- использование протеосомных антагонистов [55].

Отдельно стоит выделить инфламмасому NLRP3, которая считается достаточно универсальным патогенетическим биомаркером для многих заболеваний (диабет, болезнь Альцгеймера, метаболический синдром и атеросклероз), где тканедеструктивное гипервоспаление играет не последнюю роль [56].

С учётом рассмотренного выше механизма работы NLRP3 (рис. 5) её блокирование рассматривается весьма перспективным методом подавления синдрома цитокиновой реактивности при COVID-19, а ряд таргетных средств уже проходят II фазу клинических испытаний. При этом во многих случаях мониторинг эффективности ингибирования осуществляется путём оценки уровня ИЛ-1 β в плазме [57]. Из общеизвестных средств можно отметить аспирин (тормозящий фосфорилирование ИКВ α) и глюкокортикоиды (снижают специфичность контакта NF-κB с целевыми генами) [58].

Тераностика фиброза лёгких

Фиброз — это процесс зарастания соединительной тканью очагов поражения, в результате чего снижается растяжимость лёгких и вслед за тем быстро прогрессирует сердечно-лёгочная недостаточность, которая и приводит к столь печальным исходам острого респираторного дистресс-синдрома.

Ранее было показано, что во главе иерархии процессов, усугубляющих фиброз лёгочной ткани и вызванных гибелью инфицированных альвеолярных

клеток, стоит рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) [59]. Моделирование фиброза на мышечных моделях [60] подтвердило, что при разрушении клеток активизируется EGFR-опосредованное взаимодействие «ранозаживляющих генов» (рис. 8).

Методы регуляции фиброза разобраны пока только на мышечных моделях [60], где блокирование достигалось путём использования афатиниба, который относится к классу ТКИ. Препараты этого класса в первую очередь регулярно проходят скрининг на предмет эффективности при COVID-19 [61].

Белок EGFR может оказаться перспективным объектом для экспресс-тестирования, поскольку, с одной стороны, он является известным биомаркером избыточной пролиферации клеток (при онкологии), а метод его иммуногистохимического окрашивания сертифицирован, стандартизирован и внесён в клинические рекомендации по назначению ТКИ⁷, которые нередко служат способом альтернативной терапии для осложнённых вирусных инфекций.

Терапевтическое перепрограммирование иммунитета. CAR-NK-технология

Говоря о перепрограммировании иммунных клеток, в данном случае NK-клеток, подразумевается наделение их несвойственными им функциями специфического распознавания, чтобы поддержать первый эшелон противовирусной обороны и выиграть время до формирования специфичного иммунитета.

Процесс формирования специфичного иммунитета при SARS-CoV-2 порой занимает более 2–3 нед, а за это время уже могут развиваться осложнения. Тем более, что данный процесс может пролонгироваться, поскольку COVID-19 нередко подавляет T-клеточный иммунитет.

В то же время процент NK исходно невысок, и вирусные антигены на поверхности заражённых клеток они точно распознавать не умеют. Задача перепрограммирования как раз в том и состоит, чтобы научить NK узнавать конкретно те самые клетки, в которые проникает и размножается вирус.

Толчком к программированию послужила технология создания CAR-терапии при лейкозах [62], когда цитотоксические T-лимфоциты обучают распознавать «вражеский» антиген, минуя стадии презентации его B-клетками и наработки специфичного клона. Примером подобного подхода могут служить клинические испытания⁸, проводимые Чунцинским медицинским центром, в рамках которого модифи-

цированные NKG2D-ACE-CAR-NK-клетки нацеливаются сразу на две мишени: NKG2DL (биомаркер стресса клетки или её инфицирования; в норме практически не выражен) и S-белок оболочки SARS-CoV-2. Таким образом, «под прицел» попадают преимущественно все инфицированные коронавирусом клетки организма.

Дополнительно пациенту предполагается введение коктейля из его собственных перепрограммированных NK-клеток, экспрессирующих ИЛ-15, с антителом, подавляющим синтез ГМ-КСФ. ИЛ-15 является известным индуктором NK и цитотоксических T-лимфоцитов при антивирусном ответе [63], он будет поддерживать рост и пролиферацию NK на постоянном уровне. ГМ-КСФ — один из ключевых цитокинов воспаления, «виновных» в развитии опасного для жизни респираторного дистресс-синдрома, требующего применения интенсивной терапии.

Стоит отметить, что в отношении ГМ-КСФ, приводящего к чрезмерному воспалению в лёгких, компания «Kinevant Sciences» готовит испытания нейтрализующего антитела — гимсилумаба — в качестве вспомогательной терапии при лечении коронавирусной инфекции. В настоящее время проводится апробация NKG2D-ACE-CAR NK/NK-IL15, NK-GM-CFF-терапии в рамках II фазы клинических испытаний⁹.

Промежуточные выводы. *Общий смысл вышеописанных манипуляций:*

а) *максимально быстро обучить клетки иммунитета с минимальными затратами внутренних резервов организма;*

б) *T-клетки и сами обучаются, но делают это медленно, а времени «в обрез»;*

в) *NK срабатывают, но их мало, они быстро «выдыхаются», часто бывают неспецифичными. Прикладная наука дополняет их работу всеми «знаниями» в области иммунологии, клеточной и молекулярной биологии, превращая NK в своеобразные клеточные биороботы.*

Заключение

В обзоре рассмотрены прежде всего патогенетические аспекты характера взаимодействия высокопатогенных коронавирусов с иммунной системой и способы её коррекции¹⁰.

«Логика» вируса такова, чтобы перестроить функционирование иммунной системы под собственные «интересы».

⁷ COVID-19 Treatment Guidelines.

URL: <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov>

⁸ A Phase I/II study of universal off-the-shelf NKG2D-ACE2 CAR-NK cells for therapy of COVID-19. ClinicalTrials.gov. NCT04324996.

URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04324996>

⁹ A study to assess the efficacy and safety of gimsilumab in subjects with lung injury or acute respiratory distress syndrome secondary to COVID-19 (BREATHE). ClinicalTrials.gov. NCT04351243. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04351243>

¹⁰ В обзоре сознательно опущены обязательные стандартные антивирусные методы лечения и способы поддерживающей терапии.

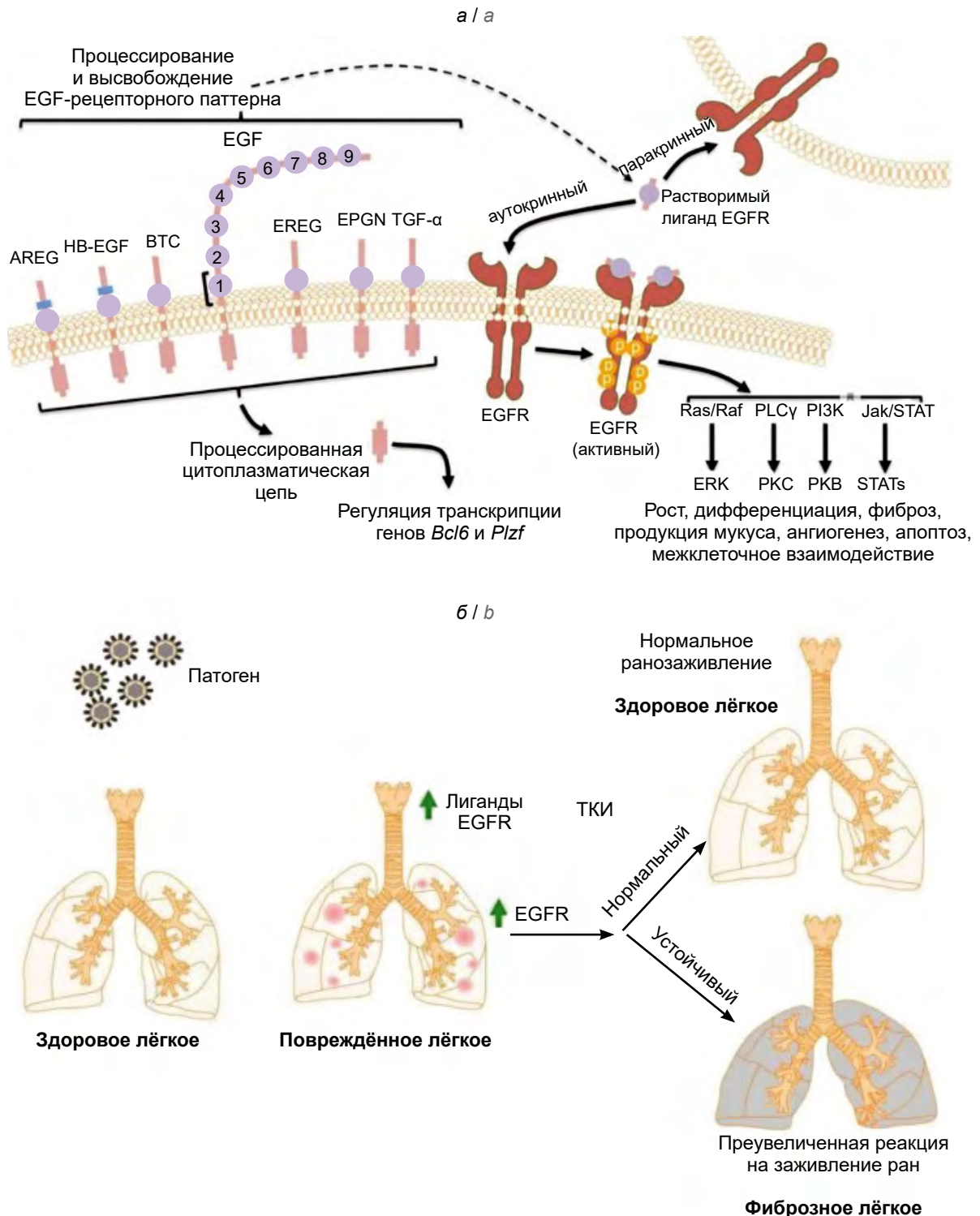


Рис. 8. Схема функционирования представителей семейства эпидермальных факторов роста при фиброзе лёгких и способ терапевтического ингибирования EGFR (рисунок заимствован из публикации [60] и адаптирован в соответствии с правилами издателя).

а — при повреждении активируются заживляющие белки, EGFR-лиганды: эпидермальный фактор роста (EGF), амфирегулин (AREG), гепаринсвязывающий эпидермальный фактор роста (HB-EGF), бетацеллюлин (BTC), эпирегулин (EREG), эпителиальный митоген (EPGN) и трансформирующий фактор роста (TGF-α). Их действия подобны группе быстрого реагирования: «заделать, заштопать», инактивировать очаг повреждения;

б — инфицирование вирусом повреждает клетки лёгких, что приводит к выбросу EGFR-лигандов, избыточному синтезу EGFR. Тирозинкиназные ингибиторы (ТКИ) экспрессии EGFR нормализуют работу «генов заживления» и блокируют фиброз лёгких.

Fig. 8. Function of EGF family in pulmonary fibrosis and therapeutic inhibition of EGFR expression (the figure is obtained from publication of T. Venkataraman *et al.* [60] in accordance with the publisher's rules).
URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5507769/>

Схема перестройки выглядит следующим образом:

1) на первое место выходит COVID-индуцированный иммунодефицит;

2) цитокиновый шторм также играет в интересах вируса, поскольку он фактически сводится к пролиферации клеток, в которых сам же и размножается, без особого ущерба для себя, вследствие подавления функции противовирусных эффекторных клеток.

Иммунотерапевтическая стратегия, по мнению автора, может быть составлена следующим образом:

а) таргетное блокирование цитокинового шторма;

б) мониторинг ключевых молекулярных «игроков» патогенных каскадов для оценки эффективности терапии и её своевременного назначения;

в) укрепление первого эшелона обороны на уровне пролонгирования функции гуморального иммунитета с изысканием возможности его перепрограммирования.

Стоит отметить, что SARS-CoV-2 настолько перетряхнул сознание врачей о респираторных инфекциях, что мы сейчас буквально онлайн наблюдаем беспрецедентную интенсификацию взаимодействия классической медицины с высокотехнологичными подходами на уровне таргетной терапии и биоинженерии. Не факт, что все они придется к месту, поскольку в ряде случаев это весьма затратные и трудоёмкие технологии (например, подготовка реконвалесцентной плазмы или генетическое перепрограммирование иммунных клеток), однако совершенно очевидно, что подобное сотрудничество медико-биологических дисциплин приносит не только научную, но и социальную пользу в плане доступности высокотехнологичных разработок для более широких слоёв населения.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Karadag E. Increase in COVID-19 cases and case-fatality and case-recovery rates in Europe: A cross-temporal meta-analysis. *J. Med. Virol.* 2020; 92(9): 1511–7. <https://doi.org/10.1002/jmv.26035>
2. Zhao Y., Lu R., Shen J., Xie Z., Liu G., Tan W. Comparison of viral and epidemiological profiles of hospitalized children with severe acute respiratory infection in Beijing and Shanghai, China. *BMC Infect. Dis.* 2019; 19(1): 729. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4385-5>
3. Etemadi M.R., Jalilian F.A., Othman N., Lye M-S., Ansari S., Yubbu P., et al. Diversity of respiratory viruses detected among hospitalized children with acute lower respiratory tract infections at Hospital Serdang, Malaysia. *J. Virol. Methods.* 2019; 269: 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.03.013>
4. Chan C.Y., Low J.G., Wyone W., Oon L.L.E., Tan B.H. Survey of respiratory virus in patients hospitalised for acute exacerbations of heart failure — a prospective observational. *Ann. Acad. Med. Singap.* 2018; 47(11): 445–50.
5. Лободанов С.А., Киселев И.С., Аммури Ю.И., Горбаленя А.Е., Зверев В.В., Файзулов Е.Б. и др. Исследование вирусной структуры риновирусов и коронавирусов, циркулировавших в Московском регионе в период с 2007 по 2012 г. *Вопросы вирусологии.* 2015; 60(3): 31–6.
6. Werner E. Smoke cloud pneumonia, a new atypical pneumonia in influenza diseases. *Z. Gesamte Inn. Med.* 1986; 41(7): 208–10.
7. Dawood F.S., Iuliano A.D., Reed C., Meltzer M.I., Shay D.K., Cheng P., et al. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study. *Lancet Infect. Dis.* 2012; 12(9): 687–95. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(12\)70121-4](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(12)70121-4)
8. Karponis D. Rheumatoid arthritis: the journey in pursuit of a cure. *Rheumatol. Adv. Pract.* 2017; 1(1): rlx008. <https://doi.org/10.1093/rap/rlx008>
9. Okamoto H., Kobayashi A., Yamanaka H. Cytokines and chemokines in neuropsychiatric syndromes of systemic lupus erythematosus. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010; 2010: 268436. <https://doi.org/10.1155/2010/268436>
10. Biggioggero M., Crotti C., Becciolini A., Favalli E.G. Tocilizumab in the treatment of rheumatoid arthritis: an evidence-based review and patient selection. *Drug Des. Devel. Ther.* 2019; 13: 57–70. <https://doi.org/10.2147/dddt.s150580>
11. Cheung O.Y., Chan J.W.M., Ng C.K., Koo C.K. The spectrum of pathological changes in severe acute respiratory syndrome (SARS). *Histopathology.* 2004; 45(2): 119–24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2004.01926.x>
12. Calabrese F., Pezzuto F., Fortarezza F., Hofman P., Kern I., Pannizo A., et al. Pulmonary pathology and COVID-19: lessons from autopsy. The experience of European pulmonary pathologists. *Virchows Arch.* 2020; 477(3): 359–72. <https://doi.org/10.1007/s00428-020-02886-6>
13. Franks T.J., Chong P.Y., Chui P., Galvin J.R., Lourens R.M., Reid A.H., et al. Lung pathology of severe acute respiratory syndrome (SARS): a study of 8 autopsy cases from Singapore. *Hum. Pathol.* 2003; 34(8): 743–8. [https://doi.org/10.1016/s0046-8177\(03\)00367-8](https://doi.org/10.1016/s0046-8177(03)00367-8)
14. Hsiao C.H., Wu M.Z., Chen C.L., Hsueh P.R., Hsieh S.W., Yang P.C., et al. Evolution of pulmonary pathology in severe acute respiratory syndrome. *J. Formos. Med. Assoc.* 2005; 104(2): 75–81.
15. Gu J., Korteweg C. Pathology and pathogenesis of severe acute respiratory syndrome. *Am. J. Pathol.* 2007; 170(4): 1136–47. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.061088>
16. Vabret N., Britton G.J., Gruber C., Hegde S., Kim J., Kuksin M., et al. Immunology of COVID-19: current state of the science. *Immunity.* 2020; 52(6): 910–41. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.05.002>
17. Ding Y., Wang H., Shen H., Li Z., Geng J., Han H., et al. The clinical pathology of severe acute respiratory syndrome (SARS): a report from China. *J. Pathol.* 2003; 200(3): 282–9. <https://doi.org/10.1002/path.1440>
18. Tse G.M.K., To K.F., Chan P.K.S., Lo A.W.I., Ng K.C., Wu A., et al. Pulmonary pathological features in coronavirus associated severe acute respiratory syndrome (SARS). *J. Clin. Pathol.* 2004; 57(3): 260–5. <https://doi.org/10.1136/jcp.2003.013276>
19. Gu J., Gong E., Zhang B., Zheng J., Gao Z., Zhong Y., et al. Multiple organ infection and the pathogenesis of SARS. *J. Exp. Med.* 2005; 202(3): 415–24. <https://doi.org/10.1084/jem.20050828>
20. Hwang D.M., Chamberlain D.W., Poutanen S.M., Low D.E., Asa S.L., Butany J. Pulmonary pathology of severe acute respiratory syndrome in Toronto. *Mod. Pathol.* 2005; 18(1): 1–10. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800247>
21. Nicholls J.M., Poon L.L.M., Lee K.C., Ng W.F., Lai S.T., Leung C.Y., et al. Lung pathology of fatal severe acute respiratory syndrome. *Lancet.* 2003; 24; 361(9371): 1773–8. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(03\)13413-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)13413-7)
22. Leung W.K., To K.F., Chan P.K.S., Chan H.L.Y., Wu A.K.L., Lee N., et al. Enteric involvement of severe acute respiratory

- syndrome-associated coronavirus infection. *Gastroenterology*. 2003; 125(4): 1011–7. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(03\)01215-0](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(03)01215-0)
23. Chu K.H., Tsang W.K., Tang C.S., Lam M.F., Lai F.M., To K.F., et al. Acute renal impairment in coronavirus-associated severe acute respiratory syndrome. *Kidney Int.* 2005; 67(2): 698–705. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.67130.x>
 24. Wu V.C., Hsueh P.R., Lin W.C., Huang J.W., Tsai H.B., Chen Y.M., et al. Acute renal failure in SARS patients: more than rhabdomyolysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2004; 19(12): 3180–2. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfh436>
 25. Wei L., Sun S., Xu C.H., Zhang J., Xu Y., Zhu H., et al. Pathology of the thyroid in severe acute respiratory syndrome. *Hum. Pathol.* 2007; 38(1): 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2006.06.011>
 26. Nakajima N., Asahi-Ozaki Y., Nagata N., Sato Y., Dizon F., Paladin F.J., et al. SARS coronavirus-infected cells in lung detected by new *in situ* hybridization technique *Jpn J. Infect. Dis.* 2003; 56(3): 139–41.
 27. Farcas G.A., Poutanen S.M., Mazzulli T., Willey B.M., Butany J., Asa S.L., et al. Fatal severe acute respiratory syndrome is associated with multiorgan involvement by coronavirus. *J. Infect. Dis.* 2005; 191(2): 193–7. <https://doi.org/10.1086/426870>
 28. Channappanavar R., Perlman S. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Semin. Immunopathol.* 2017; 39(5): 529–39. <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0629-x>
 29. Sallusto F., Lanzavecchia A. The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. *Arthritis Res.* 2002; 4(Suppl. 3): S127–32. <https://doi.org/10.1186/ar567>
 30. Ziegler C.G.K., Allon S.J., Nyquist S.K., Mbanjo I.M., Miao V.N., Tzouanas C.N., et al. SARS-CoV-2 receptor ACE2 is an interferon-stimulated gene in human airway epithelial cells and is detected in specific cell subsets across tissues. *Cell.* 2020; 181(5): 1016–1035.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.035>
 31. Hayden M.S., Ghosh S. NF- κ B in immunobiology. *Cell Res.* 2011; 21(2): 223–44. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.13>
 32. Cameron M.J., Kelvin A.A., Leon A.J., Cameron C.M., Ran L., Xu L., et al. Lack of innate interferon responses during SARS coronavirus infection in a vaccination and reinfection ferret model. *PLoS One.* 2012; 7(9): e45842. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045842>
 33. Minakshi R., Padhan K., Rani M., Khan N., Ahmad F., Jameel S. The SARS Coronavirus 3a protein causes endoplasmic reticulum stress and induces ligand-independent downregulation of the type 1 interferon receptor. *PLoS ONE.* 2009; 4(12): e8342. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008342>
 34. Zhang Y.Y., Li B.R., Ning B.T. The comparative immunological characteristics of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 coronavirus infections. *Front. Immunol.* 2020; 11: 2033. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02033>
 35. Wathelet M.G., Orr M., Frieman M.B., Baric R.S. Severe acute respiratory syndrome coronavirus evades antiviral signaling: role of nsp1 and rational design of an attenuated strain. *J. Virol.* 2007; 81(21): 11620–33. <https://doi.org/10.1128/jvi.00702-07>
 36. Lebeau G., Vagner D., Frumence E., Ah-Pine F., Guillot X., Nobecourt E., et al. Deciphering SARS-CoV-2 Virologic and Immunologic Features. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(16): 5932. <https://doi.org/10.3390/ijms21165932>
 37. Clay C., Donart N., Fomukong N., Knight J.B., Lei W., Price L., et al. Primary severe acute respiratory syndrome coronavirus infection limits replication but not lung inflammation upon homologous rechallenge. *J. Virol.* 2012; 86(8): 4234–44. <https://doi.org/10.1128/jvi.06791-11>
 38. Liu L., Wei Q., Lin Q., Fang J., Wang H., Kwok H., et al. Anti-spike IgG causes severe acute lung injury by skewing phage responses during acute SARS-CoV infection. *JCI Insight.* 2019; 4(4): e123158. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.123158>
 39. Portt L., Norman G., Clapp C., Greenwood M., Greenwood M.T. Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011; 1813(1): 238–259. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.10.010>
 40. Marfè G., Tafani M., Fiorito F., Pagnini U., Iovane G., De Martino L. Involvement of FOXO transcription factors, TRAIL-FasL/Fas, and sirtuin proteins family in canine coronavirus type II-induced apoptosis. *PLoS One.* 2011; 6(11): e27313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027313>
 41. Fulda S. Targeting c-FLICE-like inhibitory protein (CFLAR) in cancer. *Expert. Opin. Ther. Targets.* 2013; 17(2): 195–201. <https://doi.org/10.1517/14728222.2013.736499>
 42. Ivanisenko N.V., Seyrek K., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A., Lavrik I.N. The role of death domain proteins in host response upon SARS-CoV-2 infection: modulation of programmed cell death and translational applications. *Cell Death Discov.* 2020; 6: 101. <https://doi.org/10.1038/s41420-020-00331-w>
 43. Chen Z., Wherry J.E. T cell responses in patients with COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.* 2020; 20(9): 529–36. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0402-6>
 44. Lian L., Ling X., Chen L. T cell response in patients with COVID-19. *Blood Science.* 2020; 2(3): 76–8. <https://doi.org/10.1097/BS9.0000000000000050>
 45. Nikirenkov Y. Efficiency of tocilizumab therapy for an exacerbation of systemic lupus erythematosus: a review of literature. *Acute Chronic. Dis.* 2018; 2(1): 1000103. <https://doi.org/10.14412/1996-7012-2017-3-85-90>
 46. Hashizume M. Outlook of IL-6 signaling blockade for COVID-19 pneumonia. *Inflamm. Regen.* 2020; 40: 24. <https://doi.org/10.1186/s41232-020-00134-7>
 47. Steenholdt C. Personalized therapy with TNF-inhibitors in Crohn's disease: optimizing treatment outcomes by monitoring drug levels and anti-drug antibodies. *Dan. Med. J.* 2016; 63(8): B5270.
 48. Gianfrancesco M., Hyrich K.L. Characteristics associated with hospitalisation for COVID-19 in people with rheumatic disease: data from the COVID-19 Global Rheumatology Alliance physician-reported registry. *Ann. Rheum. Dis.* 2020; 79: 859–66. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2020-218713>
 49. Mahase E. Covid-19: Anti-TNF drug adalimumab to be trialled for patients in the community. *BMJ.* 2020; 371: m3847. <https://doi.org/10.1136/bmj.m3847>
 50. Fielding C.A., McLoughlin R.M., McLeod L., Colmont C.S., Najdovska M., Grail D., et al. IL-6 regulates neutrophil trafficking during acute inflammation via STAT3. *J. Immunol.* 2008; 181(3): 2189–95. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.3.2189>
 51. Velazquez-Salinas L., Verdugo-Rodriguez A., Rodriguez L.L., Borca M.V. The role of interleukin 6 during viral infections. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 1057. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102537>
 52. Fragoulis G.E., McInnes I.B., Siebert S. JAK-inhibitors. New players in the field of immune-mediated diseases, beyond rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2019; 58(Suppl. 1): i43–i54. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keu276>
 53. Kotyla P.J., Islam M.A., Engelmann M. Clinical Aspects of Janus Kinase (JAK) inhibitors in the cardiovascular system in patients with rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(19): 7390. <https://doi.org/10.3390/ijms21197390>
 54. Isomaki P., Junttila I., Vidqvist K.L., Korpela M., Silvennoinen O. The activity of JAK-STAT pathways in rheumatoid arthritis: constitutive activation of STAT3 correlates with interleukin 6 levels. *Rheumatology (Oxford).* 2015; 54(6): 1103–13. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keu430>
 55. Liu T., Zhang L., Joo D., Sun S.C. NF- κ B signaling in inflammation. *Sig. Transduct. Target. Ther.* 2017; 2: 17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
 56. Zahid A., Li B., Kombe A.J.K., Jin T., Tao J. Pharmacological Inhibitors of the NLRP3 Inflammasome. *Front. Immunol.* 2019; 10: 2538. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02538>

57. Freeman T.L., Swartz T.H. Targeting the NLRP3 Inflammasome in Severe COVID-19. *Front. Immunol.* 2020; 11: 1518. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01518>
58. Kircheis R., Haasbach E., Lueftenegger D., Heyken W.T., Ocker M., Planz O. NF- κ B pathway as a potential target for treatment of critical stage COVID-19 patients. *Front. Immunol.* 2020; 11: 598444. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.598444>
59. Werner S., Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol. Rev.* 2003; 83(3): 835–70. <https://doi.org/10.1152/physrev.2003.83.3.835>
60. Venkataraman T., Frieman M.B. The role of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in SARS coronavirus-induced pulmonary fibrosis. *Antiviral. Res.* 2017; 143: 142–50. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.03.022>
61. Weisberg E., Parent A., Yang P.L., Sattler M., Liu Q., Liu Q., et al. Repurposing of kinase inhibitors for treatment of COVID-19. *Pharm. Res.* 2020; 37(9): 167. <https://doi.org/10.1007/s11095-020-02851-7>
62. Pehlivan K.C., Duncan B.B., Lee D.W. CAR-T cell therapy for acute lymphoblastic leukemia: transforming the treatment of relapsed and refractory. *Disease. Curr. Hematol. Malig. Rep.* 2018; 13(5): 396–406. <https://doi.org/10.1007/s11899-018-0470-x>
63. Собко Е.А., Соловьева И.А., Демко И.В., Крапошина А.Ю., Гордеева Н.В., Чубарова С.В. и др. Интерлейкин 15 и его роль в иммунном воспалении. *Бюллетень физиологии и патологии дыхания.* 2015; (57): 113–9.
- REFERENCES
1. Karadag E. Increase in COVID-19 cases and case-fatality and case-recovery rates in Europe: A cross-temporal meta-analysis. *J. Med. Virol.* 2020; 92(9): 1511–7. <https://doi.org/10.1002/jmv.26035>
2. Zhao Y., Lu R., Shen J., Xie Z., Liu G., Tan W. Comparison of viral and epidemiological profiles of hospitalized children with severe acute respiratory infection in Beijing and Shanghai, China. *BMC Infect. Dis.* 2019; 19(1): 729. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4385-5>
3. Etemadi M.R., Jalilian F.A., Othman N., Lye M-S., Ansari S., Yubbu P., et al. Diversity of respiratory viruses detected among hospitalized children with acute lower respiratory tract infections at Hospital Serdang, Malaysia. *J Virol. Methods.* 2019; 269: 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.03.013>
4. Chan C.Y., Low J.G., Wyone W., Oon L.L.E., Tan B.H. Survey of respiratory virus in patients hospitalised for acute exacerbations of heart failure – a prospective observational. *Ann. Acad. Med. Singap.* 2018; 47(11): 445–50.
5. Lobodanov S.A., Kiselev I.S., Ammur Yu.I., Gorbalenya A.E., Zverev V.V., Fayzuloev E.B. et al. The prevalence of the human rhinoviruses and coronaviruses circulating in the Moscow region during 2007-2012. *Voprosy virusologii.* 2015; 60(3): 31–6.
6. Werner E. Smoke cloud pneumonia, a new atypical pneumonia in influenza diseases. *Z. Gesamte Inn. Med.* 1986; 41(7): 208–10.
7. Dawood F.S, Iuliano A.D., Reed C., Meltzer M.I., Shay D.K., Cheng P., et al. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study. *Lancet Infect. Dis.* 2012; 12(9): 687–95. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(12\)70121-4](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(12)70121-4)
8. Karponis D. Rheumatoid arthritis: the journey in pursuit of a cure. *Rheumatol. Adv. Pract.* 2017; 1(1): rlx008. <https://doi.org/10.1093/rap/rlx008>
9. Okamoto H., Kobayashi A., Yamanaka H. Cytokines and chemokines in neuropsychiatric syndromes of systemic lupus erythematosus. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010; 2010: 268436. <https://doi.org/10.1155/2010/268436>
10. Biggoggero M., Crotti C., Becciolini A., Favalli E.G. Tocilizumab in the treatment of rheumatoid arthritis: an evidence-based review and patient selection. *Drug Des. Devel. Ther.* 2019; 13: 57–70. <https://doi.org/10.2147/dddt.s150580>
11. Cheung O.Y., Chan J.W.M., Ng C.K., Koo C.K. The spectrum of pathological changes in severe acute respiratory syndrome (SARS). *Histopathology.* 2004; 45(2): 119–24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2004.01926.x>
12. Calabrese F., Pezzuto F., Fortarezza F., Hofman P., Kern I., Panizo A., et al. Pulmonary pathology and COVID-19: lessons from autopsy. The experience of European Pulmonary Pathologists. *Virchows Arch.* 2020; 477(3): 359–72. <https://doi.org/10.1007/s00428-020-02886-6>
13. Franks T.J., Chong P.Y., Chui P., Galvin J.R., Lourens R.M., Reid A.H., et al. Lung pathology of severe acute respiratory syndrome (SARS): a study of 8 autopsy cases from Singapore. *Hum. Pathol.* 2003; 34(8): 743–8. [https://doi.org/10.1016/s0046-8177\(03\)00367-8](https://doi.org/10.1016/s0046-8177(03)00367-8)
14. Hsiao C.H., Wu M.Z., Chen C.L., Hsueh P.R., Hsieh S.W., Yang P.C., et al. Evolution of pulmonary pathology in severe acute respiratory syndrome. *J. Formos. Med. Assoc.* 2005; 104(2): 75–81.
15. Gu J., Korteweg C. Pathology and pathogenesis of severe acute respiratory syndrome. *Am. J. Pathol.* 2007; 170(4): 1136–47. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.061088>
16. Vabret N., Britton G.J., Gruber C., Hegde S., Kim J., Kuksin M., et al. Immunology of COVID-19: current state of the science. *Immunity.* 2020; 52(6): 910–41. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.05.002>
17. Ding Y., Wang H., Shen H., Li Z., Geng J., Han H., et al. The clinical pathology of severe acute respiratory syndrome (SARS): a report from China. *J. Pathol.* 2003; 200(3): 282–9. <https://doi.org/10.1002/path.1440>
18. Tse G.M.K., To K.F., Chan P.K.S., Lo A.W.I., Ng K.C., Wu A., et al. Pulmonary pathological features in coronavirus associated severe acute respiratory syndrome (SARS). *J. Clin. Pathol.* 2004; 57(3): 260–5. <https://doi.org/10.1136/jcp.2003.013276>
19. Gu J., Gong E., Zhang B., Zheng J., Gao Z., Zhong Y., et al. Multiple organ infection and the pathogenesis of SARS. *J. Exp. Med.* 2005; 202(3): 415–24. <https://doi.org/10.1084/jem.20050828>
20. Hwang D.M., Chamberlain D.W., Poutanen S.M., Low D.E., Asa S.L., Butany J. Pulmonary pathology of severe acute respiratory syndrome in Toronto. *Mod. Pathol.* 2005; 18(1): 1–10. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800247>
21. Nicholls J.M., Poon L.L.M., Lee K.C., Ng W.F., Lai S.T., Leung C.Y., et al. Lung pathology of fatal severe acute respiratory syndrome. *Lancet.* 2003; 24; 361(9371): 1773–8. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(03\)13413-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)13413-7)
22. Leung W.K., To K.F., Chan P.K.S., Chan H.L.Y., Wu A.K.L., Lee N., et al. Enteric involvement of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection. *Gastroenterology.* 2003; 125(4): 1011–7. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(03\)01215-0](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(03)01215-0)
23. Chu K.H., Tsang W.K., Tang C.S., Lam M.F., Lai F.M., To K.F., et al. Acute renal impairment in coronavirus-associated severe acute respiratory syndrome. *Kidney Int.* 2005; 67(2): 698–705. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.67130.x>
24. Wu V.C., Hsueh P.R., Lin W.C., Huang J.W., Tsai H.B., Chen Y.M., et al. Acute renal failure in SARS patients: more than rhabdomyolysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2004; 19(12): 3180–2. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfh436>
25. Wei L., Sun S., Xu C.H., Zhang J., Xu Y., Zhu H., et al. Pathology of the thyroid in severe acute respiratory syndrome. *Hum. Pathol.* 2007; 38(1): 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2006.06.011>
26. Nakajima N., Asahi-Ozaki Y., Nagata N., Sato Y., Dizon F., Paladin F.J., et al. SARS coronavirus-infected cells in lung detected by new in situ hybridization technique *Jpn J. Infect. Dis.* 2003; 56(3): 139–41.

27. Farcas G.A., Poutanen S.M., Mazzulli T., Willey B.M., Butany J., Asa S.L., et al. Fatal severe acute respiratory syndrome is associated with multiorgan involvement by coronavirus. *J. Infect. Dis.* 2005; 191(2): 193–7. <https://doi.org/10.1086/426870>
28. Channappanavar R., Perlman S. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Semin. Immunopathol.* 2017; 39(5): 529–39. <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0629-x>
29. Sallusto F., Lanzavecchia A. The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. *Arthritis Res.* 2002; 4(Suppl. 3): S127–32. <https://doi.org/10.1186/ar567>
30. Ziegler C.G.K., Allon S.J., Nyquist S.K., Mbano I.M., Miao V.N., Tzouanas C.N., et al. SARS-CoV-2 receptor ACE2 is an interferon-stimulated gene in human airway epithelial cells and is detected in specific cell subsets across tissues. *Cell.* 2020; 181(5): 1016–1035.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.035>
31. Hayden M.S., Ghosh S. NF- κ B in immunobiology. *Cell Res.* 2011; 21(2): 223–44. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.13>
32. Cameron M.J., Kelvin A.A., Leon A.J., Cameron C.M., Ran L., Xu L., et al. Lack of innate interferon responses during SARS coronavirus infection in a vaccination and reinfection ferret model. *PLoS One.* 2012; 7(9): e45842. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045842>
33. Minakshi R., Padhan K., Rani M., Khan N., Ahmad F., Jameel S. The SARS Coronavirus 3a protein causes endoplasmic reticulum stress and induces ligand-independent downregulation of the type 1 interferon receptor. *PLoS ONE.* 2009; 4(12): e8342. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008342>
34. Zhang Y.Y., Li B.R., Ning B.T. The comparative immunological characteristics of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 coronavirus infections. *Front. Immunol.* 2020; 11: 2033. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02033>
35. Wathelet M.G., Orr M., Frieman M.B., Baric R.S. Severe acute respiratory syndrome coronavirus evades antiviral signaling: role of nsp1 and rational design of an attenuated strain. *J. Virol.* 2007; 81(21): 11620–33. <https://doi.org/10.1128/jvi.00702-07>
36. Lebeau G., Vagner D., Frumence E., Ah-Pine F., Guillot X., Nobecourt E., et al. Deciphering SARS-CoV-2 virologic and immunologic features. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(16): 5932. <https://doi.org/10.3390/ijms21165932>
37. Clay C., Donart N., Fomukong N., Knight J.B., Lei W., Price L., et al. Primary severe acute respiratory syndrome coronavirus infection limits replication but not lung inflammation upon homologous rechallenge. *J. Virol.* 2012; 86(8): 4234–44. <https://doi.org/10.1128/jvi.06791-11>
38. Liu L., Wei Q., Lin Q., Fang J., Wang H., Kwok H., et al. Anti-spike IgG causes severe acute lung injury by skewing phage responses during acute SARS-CoV infection. *JCI Insight.* 2019; 4(4): e123158. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.123158>
39. Portt L., Norman G., Clapp C., Greenwood M., Greenwood M.T. Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011; 1813(1): 238–259. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.10.010>
40. Marfe G., Tafani M., Fiorito F., Pagnini U., Iovane G., De Martino L. Involvement of FOXO transcription factors, TRAIL-FasL/Fas, and sirtuin proteins family in canine coronavirus type II-induced apoptosis. *PLoS One.* 2011; 6(11): e27313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027313>
41. Fulda S. Targeting c-FLICE-like inhibitory protein (CFLAR) in cancer. *Expert. Opin. Ther. Targets.* 2013; 17(2): 195–201. <https://doi.org/10.1517/14728222.2013.736499>
42. Ivanisenko N.V., Seyrek K., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A., Lavrik I.N. The role of death domain proteins in host response upon SARS-CoV-2 infection: modulation of programmed cell death and translational applications. *Cell Death Discov.* 2020; 6: 101. <https://doi.org/10.1038/s41420-020-00331-w>
43. Chen Z., Wherry J.E. T cell responses in patients with COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.* 2020; 20(9): 529–36. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0402-6>
44. Lian L., Ling X., Chen L. T cell response in patients with COVID-19. *Blood Science.* 2020; 2(3): 76–8. <https://doi.org/10.1097/BS9.0000000000000050>
45. Nikirenkov Y. Efficiency of tocilizumab therapy for an exacerbation of systemic lupus erythematosus: a review of literature. *Acute Chronic. Dis.* 2018; 2(1): 1000103. <https://doi.org/10.14412/1996-7012-2017-3-85-90>
46. Hashizume M. Outlook of IL-6 signaling blockade for COVID-19 pneumonia. *Inflamm. Regen.* 2020; 40: 24. <https://doi.org/10.1186/s41232-020-00134-7>
47. Steenholdt C. Personalized therapy with TNF-inhibitors in Crohn's disease: optimizing treatment outcomes by monitoring drug levels and anti-drug antibodies. *Dan. Med. J.* 2016; 63(8): B5270.
48. Gianfrancesco M., Hyrich K.L. Characteristics associated with hospitalisation for COVID-19 in people with rheumatic disease: data from the COVID-19 Global Rheumatology Alliance physician-reported registry. *Ann. Rheum. Dis.* 2020; 79: 859–66. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2020-218713>
49. Mahase E. Covid-19: Anti-TNF drug adalimumab to be trialled for patients in the community. *BMJ.* 2020; 371: m3847. <https://doi.org/10.1136/bmj.m3847>
50. Fielding C.A., McLoughlin R.M., McLeod L., Colmont C.S., Najdovska M., Grail D., et al. IL-6 regulates neutrophil trafficking during acute inflammation via STAT3. *J. Immunol.* 2008; 181(3): 2189–95. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.3.2189>
51. Velazquez-Salinas L., Verdugo-Rodriguez A., Rodriguez L.L., Borca M.V. The role of interleukin 6 during viral infections. *Front Microbiol.* 2019; 10: 1057. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102537>
52. Fragoulis G.E., McInnes I.B., Siebert S. JAK-inhibitors. New players in the field of immune-mediated diseases, beyond rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2019; 58(Suppl. 1): i43–i54. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/key276>
53. Kotyla P.J., Islam M.A., Engelmann M. Clinical Aspects of Janus Kinase (JAK) inhibitors in the cardiovascular system in patients with rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(19): 7390. <https://doi.org/10.3390/ijms21197390>
54. Isomaki P., Junttila I., Vidqvist K.L., Korpela M., Silvennoinen O. The activity of JAK-STAT pathways in rheumatoid arthritis: constitutive activation of STAT3 correlates with interleukin 6 levels. *Rheumatology (Oxford).* 2015; 54(6): 1103–13. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keu430>
55. Liu T., Zhang L., Joo D., Sun S.C. NF- κ B signaling in inflammation. *Sig. Transduct. Target. Ther.* 2017; 2: 17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
56. Zahid A., Li B., Kombe A.J.K., Jin T., Tao J. Pharmacological Inhibitors of the NLRP3 Inflammasome. *Front. Immunol.* 2019; 10: 2538. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02538>
57. Freeman T.L., Swartz T.H. Targeting the NLRP3 inflammasome in severe COVID-19. *Front. Immunol.* 2020; 11: 1518. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01518>
58. Kircheis R., Haasbach E., Lueftenegger D., Heyken W.T., Ocker M., Planz O. NF- κ B pathway as a potential target for treatment of critical stage COVID-19 patients. *Front. Immunol.* 2020; 11: 598444. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.598444>
59. Werner S., Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol. Rev.* 2003; 83(3): 835–70. <https://doi.org/10.1152/physrev.2003.83.3.835>
60. Venkataraman T., Frieman M.B. The role of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in SARS coronavirus-induced pulmonary fibrosis. *Antiviral. Res.* 2017; 143: 142–50. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.03.022>

ОБЗОРЫ

61. Weisberg E., Parent A., Yang P.L., Sattler M., Liu Q., Liu Q., et al. Repurposing of kinase inhibitors for treatment of COVID-19. *Pharm. Res.* 2020; 37(9): 167. <https://doi.org/10.1007/s11095-020-02851-7>
62. Pehlivan K.C., Duncan B.B., Lee D.W. CAR-T cell therapy for acute lymphoblastic leukemia: transforming the treatment of

relapsed and refractory. *Disease. Curr. Hematol. Malig. Rep.* 2018; 13(5): 396–406.

<https://doi.org/10.1007/s11899-018-0470-x>

63. Sobko E.A., Solov'eva I.A., Demko I.V., Kraposhina A.Yu., Gordeeva N.V., Chubarova S.V., et al. Interleukin 15 and its role in immune inflammation. *Byulleten' fiziologii i patologii dykhaniya.* 2015; (57): 113–9. (in Russian)

Информация об авторе

Бавыкин Андрей Сергеевич[✉] — к.м.н., доцент каф. медицинской биологии с курсом инфекционных болезней Медицинского института Тамбовского государственного университета им. Г.Р. Державина, Тамбов, Россия, bavykin.andrey2013@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-8513-597X>

Статья поступила в редакцию 25.01.2021;
принята к публикации 26.05.2021;
опубликована 20.07.2021

Information about the author

Andrey S. Bavykin[✉] — Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of medical biology with a course of infectious diseases, Medical Institute, G.R. Derzhavin Tambov State University, Tambov, Russia, bavykin.andrey2013@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-8513-597X>

The article was submitted 25.01.2021;
accepted for publication 26.05.2021;
published 20.07.2021

НАУКА И ПРАКТИКА

Научный обзор

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-130>

Разработка программных инструментов, основанных на мультиагентном моделировании и реализованных в геоинформационной системе нового поколения, для решения эпидемиологических задач

Асатрян М.Н.^{1✉}, Герасимук Э.Р.², Струков Д.Р.³, Шмыр И.С.¹, Вехов А.О.³, Ершов И.Ф.¹, Лабодин А.В.³, Ноздрачева А.В.¹, Семенов Т.А.¹, Народицкий Б.С.¹, Пронин А.В.¹

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

²Государственный университет «Дубна», Дубна, Московская область, Россия;

³Центр Пространственных исследований, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация

Цель работы — демонстрация возможностей программных инструментов, основанных на мультиагентном моделировании и реализованных в геоинформационной системе нового поколения, для решения эпидемиологических задач (на примере распространения кори в мегаполисе).

Материалы и методы. Приведены примеры использования тематических слоёв и функционала геоинформационной платформы, а также разработанной мультиагентной модели распространения кори в мегаполисе. Модель распространения кори представлена в виде 3 независимых подмоделей: модели поведения популяции, модели инфицирования и модели инфекционного процесса. Модульность и независимость подмоделей позволяют использовать необходимые статистические и клинические данные — как относящиеся непосредственно к изучаемому заболеванию, так и демографические показатели, которые анализируются и хранятся в тематических слоях платформы.

Результаты. Разработанные программные инструменты позволяют визуализировать и проводить анализ распространения заболевания на изучаемой территории с возможностью формирования отчетов, что может быть полезным и актуальным дополнением в повседневной работе специалистов, способствовать совершенствованию и углублению практических навыков и умений в соответствии с видами и задачами профессиональной деятельности, а также расширить возможности для помощи в принятии управленческих решений.

Ключевые слова: математическое моделирование, агентная модель, геоинформационные системы, прогнозирование, визуализация, пространственный анализ, эпидемиологические задачи, эпидемиологический процесс, инфекционный процесс, корь, управленческие решения

Благодарности. Выражаем особую признательность старшему научному сотруднику отдела эпидемиологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи О.Г. Николаевой, сотрудникам компании «Геоинтеллект» А.А. Панову, А.А. Дубровскому, Е.А. Пустоваловой, А.С. Чигиновой за постоянную помощь, консультации в процессе выполнения работы. Также выражаем искреннюю благодарность сотрудникам Центра им. Н.Ф. Гамалеи Е.А. Домогаровой и О.В. Шипиловой за проделанную работу и поддержку при подготовке исследований.

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

Конфликт интересов. Авторы А.О. Вехов, А.В. Лабодин являются штатными сотрудниками компании-разработчика, осуществляющей распространение продукта на территории РФ, а автор Д.Р. Струков — её генеральным директором.

Для цитирования: Асатрян М.Н., Герасимук Э.Р., Струков Д.Р., Шмыр И.С., Вехов А.О., Ершов И.Ф., Лабодин А.В., Ноздрачева А.В., Семенов Т.А., Народицкий Б.С., Пронин А.В. Разработка программных инструментов, основанных на мультиагентном моделировании и реализованных в геоинформационной системе нового поколения, для решения эпидемиологических задач. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(4):468–480.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-130>

Development of software tools based on multi-agent modeling and implemented in the new generation geographic information system for solving epidemiological problems

Marina N. Asatryan¹✉, Elita R. Gerasimuk², Denis R. Strukov³, Ilya S. Shmyr¹, Aleksey O. Vekhov³, Ivan F. Ershov¹, Andrey V. Labodin³, Anna V. Nozdracheva¹, Tatiana A. Semenenko¹, Boris S. Naroditsky¹, Alexander V. Pronin¹

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

²Dubna State University, Dubna, Moscow Region, Russia;

³Center for Spatial Researches LLC, Saint Petersburg, Russia

Abstract

The aim of the study — demonstration of the capabilities of new generation geographic information system software and agent-based modeling for solving epidemiological problems (on the example of the spread of measles in a metropolis).

Materials and methods. Examples of the use of thematic layers and the functionality of the geoinformation platform, as well as the developed multi-agent model of measles spread in the megalopolis, are given. The measles spread model is presented as following three independent sub-models or nested models: behavior model, infection model, infectious process model. The modularity and independence of the sub-models allow the use of the necessary statistical and clinical data, both directly related to the studied disease and demographic indicators, which are analyzed and stored in the thematic layers of the platform.

Results. The developed software tools allow visualizing, analyzing and short-term forecasting of the spread of the disease in the study area, with the ability to generate reports, which can be a useful and relevant addition to the daily work of specialists, contribute to the improvement and deepening of practical skills and abilities, in accordance with the types and tasks of professional activities, as well as expand opportunities for assistance in management decision making.

Keywords: *mathematical modeling, agent-based model, geographic information systems, forecasting, visualization, spatial analysis, epidemiological tasks, epidemic process, infectious process, measles, management decisions*

Acknowledgement. We express our special gratitude to the senior researcher of the Epidemiology department, N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology O.G. Nikolaeva, employees of the Geointellect company A.A. Panov, A.A. Dubrovsky, E.A. Pustovalova, A.S. Chigineva for constant help, advice in the process of doing the work. We also express our sincere gratitude to the staff of the N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology E.A. Domogarova and O.V. Shipilova for the work done and support in the preparation of the research.

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

Conflict of interest. Authors A.O. Vekhov, A.V. Labodin are full-time employees of a development company that distributes the product in the territory of the Russian Federation, and the author D.R. Strukov became its general director.

For citation: Asatryan M.N., Gerasimuk E.R., Strukov D.R., Shmyr I.S., Vekhov A.O., Ershov I.F., Labodin A.V., Nozdracheva A.V., Semenenko T.A., Naroditsky B.S., Pronin A.V. Development of software tools based on multi-agent modeling and implemented in the new generation geographic information systems for solving epidemiological problems. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii.* 2021;98(4):468–480.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-130>

Введение

Сезонный рост заболеваемости, возникновение вспышек и эпидемий инфекционных заболеваний, обусловленных как известными возбудителями, так и «новыми» патогенами, требуют своевременной организации противоэпидемических мероприятий со стороны различных структур и служб системы здравоохранения [1, 2]. В этих условиях важными составляющими для эффективного принятия решений являются оперативный анализ и прогноз эпи-

демиологической ситуации, которые могут быть обеспечены благодаря совершенствованию информационно-аналитического обеспечения [3–5].

Геоинформационные системы (ГИС) и математическое моделирование продолжают быть востребованными в качестве необходимого инструмента для решения многих задач в эпидемиологии и общественном здравоохранении [6, 7]. ГИС, как современная информационная технология для картирования и анализа объектов реального мира, объ-

единяет традиционные операции работы с базами данных с преимуществами полноценной визуализации и географического (пространственного) анализа, которые предоставляет карта [8]. В настоящее время концепции и методы ГИС совместно с использованием фундаментальных принципов в области бизнес-аналитики трансформируются в более широкий класс программного обеспечения — Location Intelligence (LI). LI позволяет комплексно анализировать пространственные данные и получать ключевую аналитическую информацию, принимать лучшие оперативные, тактические и стратегические решения, а также оптимизировать важные процессы и прикладные технологии [9, 10]. Применительно к эпидемиологии LI предоставляет экспертам инструмент для отображения динамики распространения инфекционных заболеваний, позволяет проводить оценку и интеграцию различных данных (как географических, так и эпидемиологических), на основе которых проводится эпидемиологический анализ и, в случае интеграции математической модели, — оперативный прогноз эпидемиологической ситуации с визуализацией результатов на карте [11].

Математическое моделирование достаточно давно получило признание как важный инструмент в эпидемиологии [12–14]. Модели позволяют определить численные закономерности эпидемического процесса, просчитывать возможные сценарии развития эпидемий и определять их исходы, сравнивать эффективность различных стратегий профилактических и противоэпидемических мероприятий. Выбор подхода к моделированию зависит от изучаемого инфекционного заболевания, а также от определённых задач, стоящих перед исследователем [15].

Наиболее детальными и перспективными являются агентные модели [16, 17]. Они состоят из популяции агентов, окружения и набора правил, регулирующих поведение агента, что «приближает» модель к реальной ситуации [17]. Агент-ориентированные модели могут использоваться для моделирования нелинейных отношений между агентами, с более детальным проектированием межличностных взаимодействий, и тем самым решать более широкий спектр исследовательских задач, чем при использовании традиционных аналитических подходов. При агентном моделировании поведение на микроуровне влияет на динамику поведения на макроуровне, т.е. моделирование проводится «снизу вверх» [18]. Даже простые агентные модели способны демонстрировать сложные взаимодействия поведения агентов и предоставлять ценную информацию о динамике реальной системы [19].

Цель работы: демонстрация возможностей программных инструментов, основанных на мультиагентном моделировании и реализованных в ГИС нового поколения, для решения эпидемиологиче-

ских задач (на примере распространения кори в мегаполисе).

Материалы и методы

Материалом для проведения исследований послужили данные, собранные на основании анонимизированных актов и отчётов по санитарно-эпидемиологическому расследованию случаев заболевания корью за 2013–2015 гг. в Москве. Период наблюдения для анализа выбран в связи с изменением эпидемиологической ситуации по кори, когда на фоне низкого уровня заболеваемости в 2008–2010 гг. в условиях значительного охвата населения вакцинацией в декретированных возрастных группах детей (95%) и взрослых (90%) в Москве наблюдался рост заболеваемости и в 2013–2015 гг. было зарегистрировано несколько крупных вспышек кори.

Информационный массив включал сведения о больном (пол, возраст, адрес проживания, состав семьи, место работы), данные о болезни (первый день сыпи, дата заболевания, дата обращения к врачу, дата госпитализации), также сведения о прививках против кори (плановая вакцинация, ревакцинация) и описание противоэпидемических мероприятий, предпринятых в отношении контактных лиц (членов семьи, жителей дома/подъезда).

Для исследований использована отечественная геоинформационная (облачная) система с русифицированным интерфейсом «Геоинтеллект» (далее Геоплатформа) и настраиваемыми отчётами, позволяющая визуализировать на интерактивной карте аккумулированные данные. Геоплатформа хранит информацию в виде набора тематических слоёв. Обозначение «слой» применяется для организации векторных данных и представляет собой позиционные данные — плоские координаты, описывающие положение и взаимное размещение геометрически однотипных по размерности предметов территории, относящихся к одному тематическому классу. Все доступные исходные слои в платформе сгруппированы по смыслу и не включают персонифицированные данные, а содержат агрегированные метрики, показывающие места массового скопления людей¹.

Имеющиеся в системе слои были дополнены новым тематическим разделом «Слой Гамалеи». Он содержит информационный массив об инфекционной заболеваемости, который был сгруппирован для удобства визуализации по кварталам года, а также представлен по муниципальным районам (на 100 тыс. населения) и по административным округам (на 100 тыс. населения). В «Слой Гамалеи» также включены данные о заболеваемости корью, распределённые по первому дню сыпи. Для про-

¹ Федеральный закон от 27.07.2006 № 152 «О персональных данных».

id [PK] integer	id_virus smallint	status_name_ru character varying (255)	status_name_en character varying (255)	min_day character varying (255)	max_day character varying (255)	active smallint	infective smallint	position smallint
1	1	период инкубации незаразен активный	incub_not_contagious_active	10	14	1	0	1
2	2	период инкубации заразен активный	incub_contagious_active	2	3	1	1	2
3	3	продромальный период заразен актив...	premonitory_contagious_ac...	1	2	1	1	3
4	4	продромальный период заразен неакт...	premonitory_contagious_no...	2	3	0	1	4
5	5	период сыпи заразен неактивный	rash_contagious_not_active	3	4	0	1	5
6	6	период выздоровления незаразный н...	recovery_not_contagious_n...	7	10	0	0	6
7	7	здоровый	healthy	1000	1000	1	0	7

Рис. 1. Определение временных интервалов для стадий-состояний инфекционного процесса кори в модели инфекционного процесса.

Fig. 1. Determination of time intervals for stages-states of the infectious process of measles in the model of the infectious process.

ведения временного анализа заболеваемости был разработан функционал «Timeline», позволяющий «прокручивать» визуализируемые на карте данные вперед и назад (с шагом 1 день). С помощью настройки фильтра можно выбирать необходимые поля для дальнейшего анализа (например, выбор территории с высокими/низкими показателями заболеваемости, визуализация больных в пределах конкретной территории, определение периода времени для анализа).

Также в тематический раздел «Слои Гамалеи» были внесены сопроводительные сведения о проведенном эпидемиологическом расследовании в очаге по каждому конкретному случаю (источник инфекции, течение болезни, иммунный статус, мероприятия в очаге и т.д.), которые были разнесены по полям в соответствии с хранимой информацией. Включение различных тематических слоев и функционала совместно с разделом «Слои Гамалеи» предоставляет широкие возможности для визуализации и анализа данных.

При моделировании распространения кори в Москве был применен агентный подход. Модель содержит 10 645 702 агентов, которые были распределены с помощью специального алгоритма и объединены в домохозяйства на основе данных Росстата о составе семей и распределении по квартирам.

Разработанная модель распространения кори была представлена в виде 3 независимых вложенных моделей (подмоделей): модель поведения популяции, модель инфекционного процесса и модель инфицирования. Для разработки модели были использованы данные об особенностях клиники и эпидемиологии кори².

² WHO. Fact sheets / Details / Measles. URL: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/measles> (дата обращения 11.02.2021); МУ 3.1.2943-11 «Организация и проведение серологического мониторинга состояния коллективного иммунитета к инфекциям, управляемым средствами специфической профилактики (дифтерия, столбняк, коклюш, корь, краснуха, эпидемический паротит, полиомиелит, гепатит В)», 2011. URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200088401> (дата обращения 11.02.2021); МУ 3.1.3114/1-13 «Организация работы в очагах инфекционных и паразитарных болезней», 2014. URL: https://www.rosпотребнадзор.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=4872 (дата обращения 11.02.2021).

Модель поведения популяции описывает среду пребывания агентов, смену мест их нахождения по определенному расписанию (распорядку). Для моделирования (симуляции) поведения популяции каждому агенту определялось место работы (место дошкольных учреждений, школ, колледжей и университетов) с учётом транспортной сети, движения транспортных средств и перемещения агентов по определенному расписанию в соответствии с исследованиями «Яндекс». Таким образом, моделировалась ситуация, приближенная к реальной.

Модель инфекционного процесса описывает развитие инфекционного процесса в каждом агенте и его поведение в зависимости от пребывания в определенной стадии болезни. Основываясь на данных литературы³ [20], в модели инфекционного процесса были определены временные интервалы для стадий-состояний инфекционного процесса кори, а также «статус» агента в зависимости от степени заразности стадии инфекции и состояния активности агента (**рис. 1**). «Статус» агента определяет его вероятность быть источником инфекции.

Модель инфицирования описывает частоту контактов агентов, находящихся одновременно в одном и том же месте, а также вероятность инфицирования вирусом кори с учетом дистанции от больного агента.

Модульность и независимость подмоделей позволяют использовать необходимые статистические и клинические данные — как относящиеся непосредственно к изучаемому заболеванию, так и демографические показатели, которые анализируются и хранятся в тематических слоях Геоплатформы. С помощью реализованной в модели матрицы локаций, которая отражает информацию о нахождении агента в любой промежуток времени, из списка

³ Руководство ВОЗ по лабораторной диагностике кори и краснухи. Вторая редакция. URL: https://www.who.int/ihr/elibrary/manual_diagn_lab_mea_rub_ru.pdf (дата обращения 12.02.2021); МР № 74 «Корь: эпидемиологические особенности в период элиминации, современные возможности профилактики, диагностики и лечения. Значение серологического исследования популяционного иммунитета населения». М.; 2020.

окружающих лиц, исходя из плотности агентов и расстояния от инфицированного агента в локации, с помощью модели инфицирования происходит симуляция заражения.

В качестве входных параметров для модели поведения популяции были использованы данные тематических слоев Геоплатформы о местах проживания агентов в домохозяйствах, их структуре и половозрастном составе, о местах приложения труда с экспертной оценкой числа работающих, о школах и детских садах с экспертной оценкой числа учащихся, о прочих местах скопления людей (метро, торговые центры, торгово-развлекательные комплексы, религиозные учреждения, вокзалы, рынки и др.). Также предусмотрено добавление транспортного потока людей. В текущей версии модели действуют:

- маршрутные листы линий метро с географической привязкой к остановкам;
- маршрутные листы линий общественного транспорта (маршрутки, автобусы, троллейбусы) с географической привязкой к остановкам;
- статистика о периоде и скорости перемещения транспорта.

На основе этих данных проводится симуляция рейсов транспорта и передвижения агентов в соответствии с данными расчёта оптимального маршрута для каждого агента.

Для демонстрации возможностей разработанного программного приложения были составлены пилотные варианты задач по двум направлениям:

- задачи первого направления, или *ситуационные задачи*, ориентированы на ретроспективный анализ эпидемиологической ситуации и выявление определяющих её факторов;
- задачи второго направления, или *симуляционные задачи*, ориентированы на анализ текущей эпидемиологической ситуации, которая была смоделирована с помощью агентной модели, с возможностью проведения оперативного прогноза с учётом противоэпидемиологических мероприятий.

В задачах описаны многочисленные эпидемиологические ситуации с визуализацией на электронных картах и предложены инструменты для их решения. Условные обозначения расшифрованы в Легенде.

Результаты

Использование тематических данных (слоев) и функционала платформы для решения эпидемиологических задач

При разработке ситуационных задач за основу были взяты предварительно обработанные акты и отчёты по санитарно-эпидемиологическому рас-

Легенда инструмента (модели) распространения заболевания

- Все агенты, участвующие в конкретном расчёте распространения заболевания;
- агент, который заболевает, но ещё не заразен;
- агент болеет, появились симптомы, заразен;
- агент выздоровел, не заразен;
- 🏠 место проживания агента;
- 🛒 место посещения агента, магазин;
- 🎓 место посещения агента, учебное заведение;
- 🕌 место посещения агента, религиозное заведение;
- 👤 место посещения агента, место работы;
- оранжевая сплошная линия — от дома к работе;
- тонкая оранжевая линия — заражение агентов вторичного очага с локализацией на работе;
- фиолетовая сплошная линия — от дома к религиозному месту;
- тонкая фиолетовая линия — заражение агентов вторичного очага с локализацией в религиозном учреждении;
- синяя сплошная линия — от дома к торговому центру;
- тонкая синяя линия — заражение агентов вторичного очага с локализацией в торговом центре;
- красная сплошная линия — от дома к учебному заведению;
- тонкая красная линия — заражение агентов вторичного очага с локализацией в учебном заведении;
- чёрная линия под цветной сплошной линией — место, где заразился выделенный человек;
- тонкая чёрная линия — «от кого и где заразился выделенный агент по указанному адресу».

следованию случаев заболевания корью в Москве в 2013–2015 гг., которые были объединены и преобразованы в электронную базу данных [21].

Условия ситуационных задач включают данные больного (год рождения, пол, адрес проживания), данные о дате посещения врача, анамнезе заболевания, наличии вакцинации против кори (больного и совместно проживающих), данные о контактных лицах, дату подтверждения диагноза (корь), дату госпитализации, сведения о составе семьи. Решение ситуационных задач ориентировано на использование тематических слоёв и функционала

Геоплатформы, в том числе активное использование раздела «Слои Гамалеи».

Из условий задачи определяется адрес и осуществляется поиск конкретного дома на карте, где проживает больной корью. Затем, ориентируясь по дате заболевания из условия задачи, в меню «Слои Гамалеи» выбирается слой с данными о заболевших корью по первому дню сыпи, с использованием функционала «Фильтр слоя», например, для выбора заболевших во II квартале 2014 г. (рис. 2). В открывшемся окне содержится информация о количестве подтверждённых случаев кори по искомому адресу, о территориальных границах очага, а также информация по каждому выявленному больному, проживающему в подъезде или в доме.

Условие задачи может содержать сведения о заражении корью детей, например, в дошкольном учреждении. Для подтверждения требуется провести эпидемиологическое расследование и определить количество детей с признаками заболевания корью в пешей доступности 10 мин от конкретного детского сада. Выбираются «Объекты детской тематики» — на карте появляются значки «Дошкольные учреждения (детские сады, ясли)», затем при помощи функционала «Информация в зоне пешей доступности 2.0» высвечиваются на карте дома с выявленными больными. Определяют количество больных и в открывающемся информационном окне дополнительно изучают сопроводительную информацию по каждому адресу.

«Слои Гамалеи» также содержат относительные показатели заболеваемости (на 100 тыс. населения) по соответствующим годам в разрезе административных округов, муниципальных районов Москвы, градуированные с помощью цвета в зависимости от уровня заболеваемости. Для примера на рис. 3 представлено распределение заболеваемости корью (на 100 тыс. населения) по муниципальным округам г. Москвы во II квартале 2014 г.

Включение дополнительного инструмента «Timeline» позволяет определить количество лиц, заболевших корью в определённом муниципальном районе, например в районе Бирюлево и Восточное Бирюлево, на 38-й день после появления сыпи у первого инфицированного агента, описанного в условии задачи, которое составило 33 больных (рис. 3).

Геоплатформа позволяет осуществлять визуализацию и проводить как пространственный, так и временной анализ заболеваемости на уровне отдельных муниципальных или административных районов города, а также одновременно нескольких административных округов или в масштабе всего города.

На рис. 4 представлен фрагмент визуализации с помощью инструмента «Timeline» количества больных на территории всего города (на 11-й день выявлены 9 больных).

Таким образом, решение ситуационных задач (первого направления) ориентировано на активное

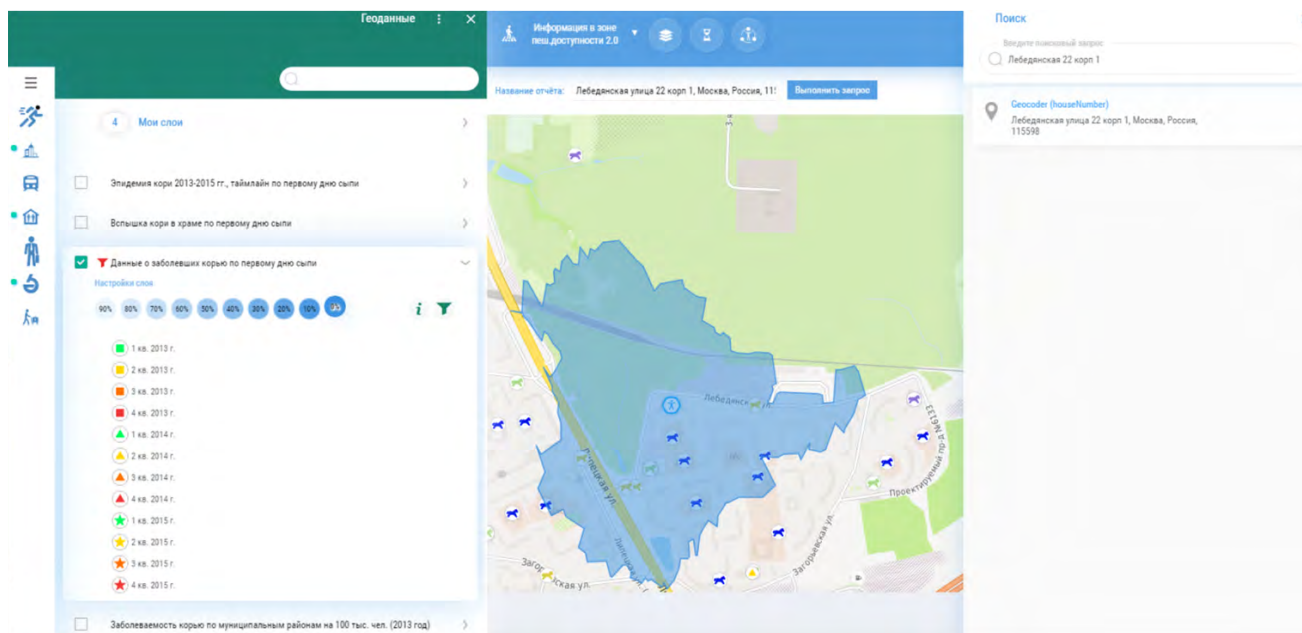


Рис. 2. Поиск конкретного дома на карте, включение необходимых слоёв платформы. Выбор и использование в меню функционала «Информация в зоне пешей доступности 2.0».



 — дошкольные учреждения (детские сады, ясли).

Fig. 2. Search for a specific house on the map, including the required platform layers. Selection and use in the menu of the “Information in the foot zone availability 2.0” tool.

 — preschool institutions (kindergartens, nurseries).

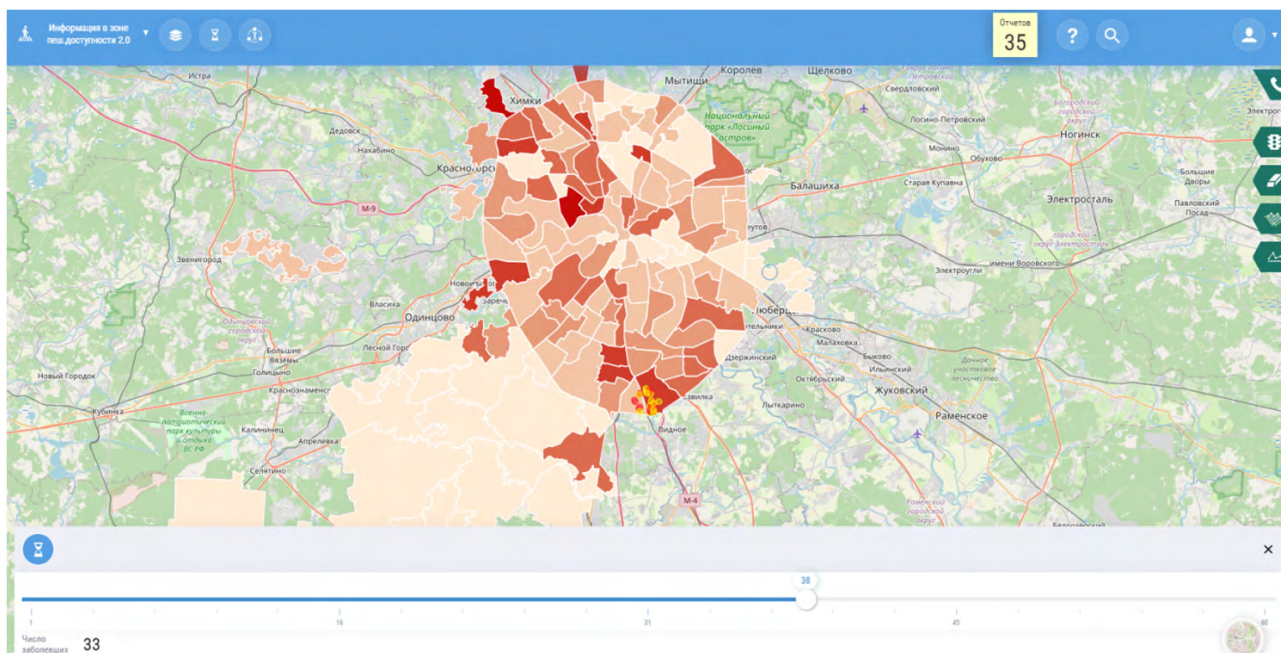


Рис. 3. Выбор и использование слоя «Заболеваемость корью по муниципальным районам на 100 тыс. населения в 2014 г.» и инструмента «Timeline».

Fig. 3. Selection and use of the layer “Measles incidence by municipalities per 100 thousand population in 2014” and the “Timeline” tool.

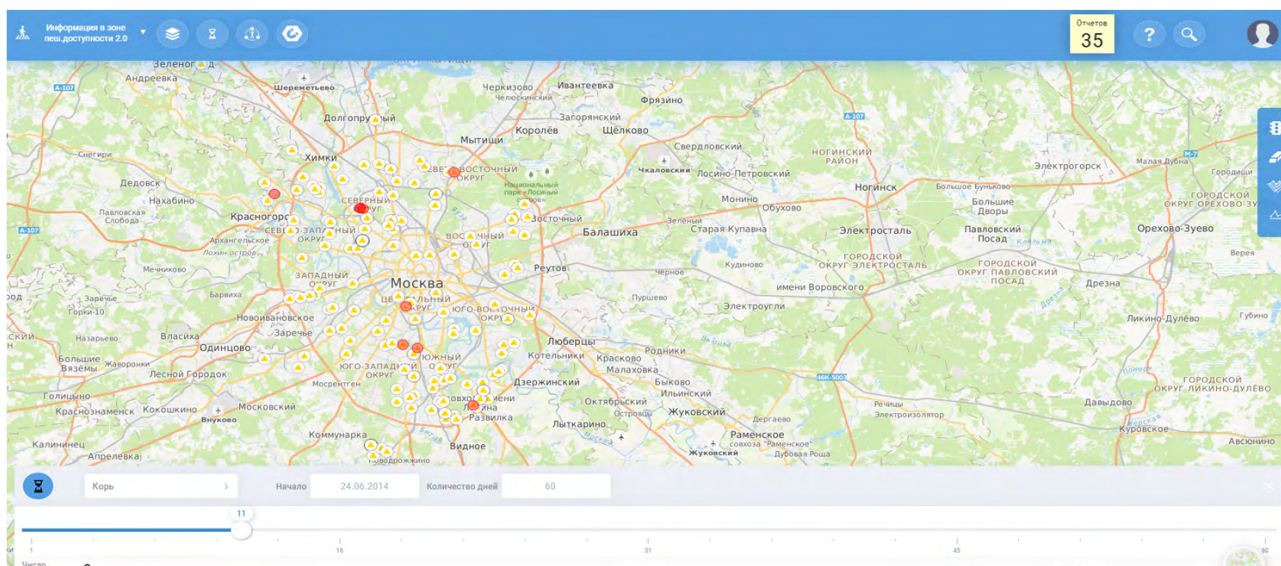


Рис. 4. Визуализация количества случаев в Москве (на 11-й день).

Fig. 4. Visualization of the number of cases in Moscow (on day 11).

использование геоинформационной платформы, которая предоставляет функциональные и визуальные возможности для проведения комплексного анализа эпидемиологической ситуации — на уровне конкретного дома, муниципального района, административного района и территории всего города. Разработанные инструменты могут быть использованы как актуальное дополнение для оценки квалификационной характеристики специалиста врача-эпидемиолога.

Использование интегрированной в геоинформационную платформу агентной модели для решения эпидемиологических задач

Задачи второго направления ориентированы на использование агентной модели, с помощью которой проводится компьютерная симуляция развития эпидемии (вспышки) кори.

В ходе проведения симуляции специалист исследует варианты развития эпидемического процесса распространения кори, анализирует и оцени-

вает влияние различных сценариев мер противодействия.

При агентном моделировании проектирование производится с максимальным приближением к реальным процессам в человеческой популяции. В рамках агентного подхода вводится понятие «агент», которое характеризует поведение одного человека, принадлежащего к определённой возрастной группе.

В модели имитируется жизнь населения согласно заданному алгоритму, определяются контакты инфицированных лиц, места посещения и одновременного пребывания. В модели реализована матрица локаций, представляющая все возможные варианты перемещения агента в течение суток. Она содержит информацию о том, в каком месте находится человек в любой промежуток времени. Далее из списка окружающих лиц, исходя из плотности агентов в локации, происходит симуляция заражения контактных агентов. Согласно алгоритму вокруг инфицированного агента создаются буферные зоны. Количество буферных зон и их наполняемость зависят от плотности агентов в данной локации. В результате формируется список восприимчивых агентов, с которыми был контакт. Вероятность заражения определяется набором правил для агента, принадлежащего к определённой возрастной группе, а также дистанцией каждого агента от инфицированного.

Процесс продолжается до последнего дня симуляции. Список инфицированных лиц пополняется каждый день. Для каждого нового инфицированного агента программа на основе стадий-состояний протекания инфекционного процесса кори рассчитывает индивидуальное течение болезни и добавляет его в список больных агентов, одновременно определяется список его контактов. Таким способом симулируется процесс распространения кори на изучаемой территории.

В качестве начальных настраиваемых параметров при моделировании выступают следующие характеристики:

- место проживания первого больного агента, выбирается конкретный адрес на карте города;
- доля вакцинированного населения (рассчитывается на основании охвата при плановой вакцинации), может настраиваться в зависимости от увеличения или уменьшения охвата;
- введение мер противодействия (экстренная вакцинация, изоляция).

В качестве настраиваемых, но зашитых для пользователя параметров предложены стадии-состояния заболевания с длительностью протекания, плотность агентов в матрице локаций и вероятность инфицирования.

Пользователь выбирает количество и список первых больных (максимально до 5 человек) по конкретному адресу или нескольким адресам, задаёт начальные условия «доля восприимчивых лиц» и устанавливает количество дней для симуляционного расчёта. Интеграция агентной модели в Геоплатформу позволяет визуализировать «цепочки» заражения с отображением на карте мест посещения инфицированного агента (источника инфекции) и лиц, контактировавших с ним.

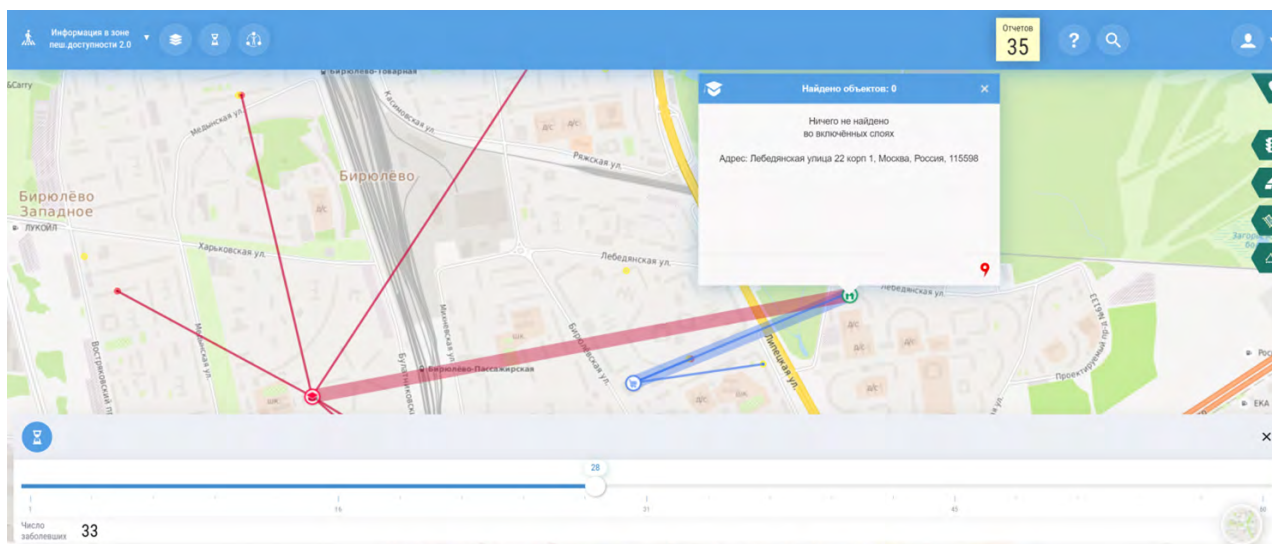


Рис. 5. Демонстрация локаций первичного очага (первый агент в доме по адресу: ул. Лебедянская д. 22, корп. 1) и выявления контактных лиц вторичного очага (от учебного заведения — тонкие красные линии, от торгового центра — синие).

Fig. 5. Demonstration of the locations of the primary focus of infection (the first agent in the house at 22 Lebedyanskaya street, building 1) and identification of the contact persons of the secondary foci (from the educational institution — thin red lines, from the shopping center — blue).

На **рис. 5** представлен пример выявления источников распространения кори через различные локации инфицированных агентов. Отображаются места и контактные лица, которые заразились от первого агента. Синяя сплошная линия ведёт от дома (первичного очага) в магазин, красная сплошная — от дома в учебное заведение, оранжевая сплошная — от дома на работу. Тонкие линии ведут к местам проживания заражённых агентов. Таким образом, эпидемиолог визуализирует процесс «заражения» (распространения вируса) восприимчивых контактных лиц, что позволяет в рамках моделирования наглядно изучать закономерности эпидемиологического процесса.

На **рис. 6** представлены взаимосвязи между агентами, находящимися в разных локациях (дом, учебное заведение, магазин). Сплошная красная линия с тонкой чёрной линией показывает, что агент, проживающий по адресу Востряковский проезд 3, корпус 1, имел контакт в учебном заведении с инфицированным человеком, который проживает (тонкая черная линия) по адресу ул. Лебедянская д. 22, корп. 1 (в первичном очаге). Существует возможность визуализировать также контактных лиц, которые инфицированы, но ещё не заразны (отмечены жёлтым цветом).

В практической работе эпидемиолога каждый случай кори подлежит расследованию, при котором устанавливаются прививочный и инфекционный анамнез заболевшего и контактных лиц. По результатам такой работы эпидемиологом определяются контингенты для проведения экстренной вакцинации или введения противокорревого иммуноглобулина.

В модели распространения кори была также заложена возможность оценки вклада различных

противоэпидемических мероприятий, предпринятых в отношении восприимчивых лиц (плановая вакцинация), больных с симптомами (изоляция) и в отношении контактных лиц (экстренная вакцинация, введение противокорревого иммуноглобулина).

Изоляция больных в модели реализуется путем исключения из математических расчётов агента с момента появления и выявления первых симптомов болезни (изоляция дома или госпитализация).

При моделировании мер в отношении контактных лиц были приняты следующие допущения:

- вакцинация проводится лицам в возрасте от 1 года до 64 лет включительно, вакцина эффективна в первые 2 сут после контакта, эффективность защиты 85%;
- для детей в возрасте 0 до 1 года и лицам старше 65 лет вводится иммуноглобулин не позднее 5 дней после контакта, эффективность защиты иммуноглобулином принята за 100%.

С помощью функционала «Экстренная вакцинация» задаются день начала вакцинации и процент охвата вакцинацией контактных лиц. При этом предполагается, что экстренную вакцинацию можно провести не ранее чем через 14 дней с момента инфицирования первого агента (появление симптомов заболевания). Для оценки вклада экстренной вакцинации в снижение заболеваемости необходимо сравнить количество больных по сценариям с и без охвата вакцинацией.

С помощью инструмента «Timeline» определяется количество больных корью лиц по сценарию без экстренной вакцинации — в нашем симуляционном примере на 60-й день количество больных составило 33 человека (**рис. 7**). После

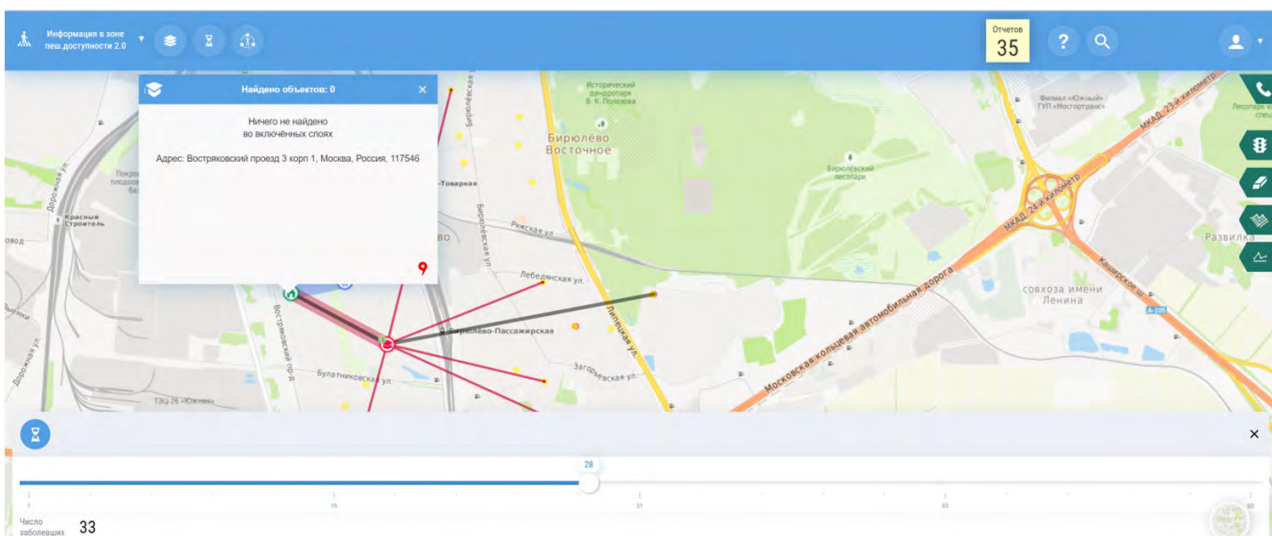


Рис. 6. Демонстрация и анализ контактов первичного (дом, ул. Лебедянская 22) и вторичного (учебное заведение) очагов заражения.

Fig. 6. Demonstration and analysis of contacts of primary (house, 22 Lebedyanskaya Street) and secondary foci of infection (educational institution).

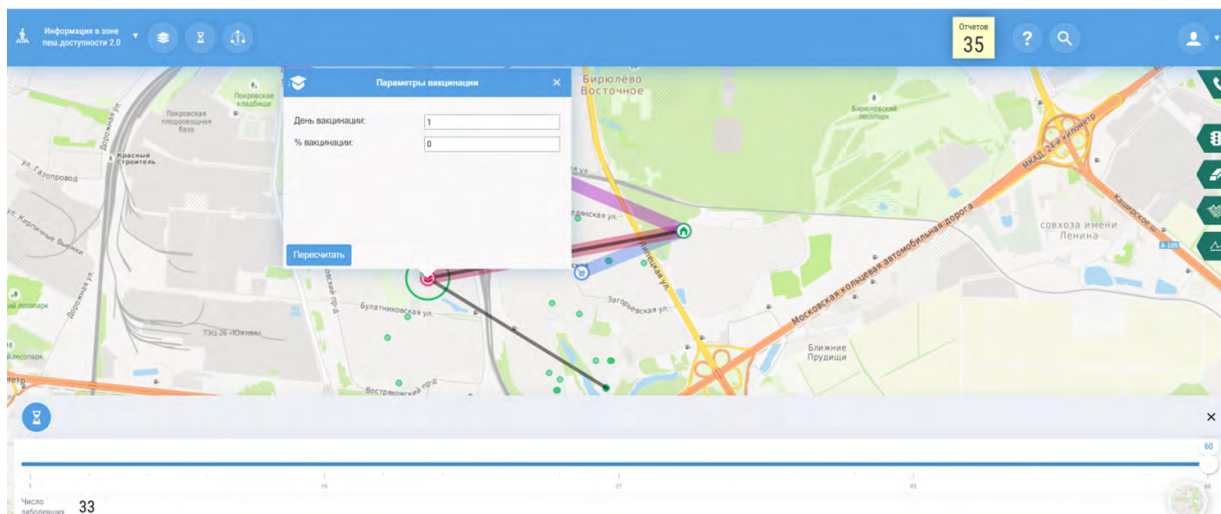


Рис. 7. Количество больных лиц на 60-й день (сценарий без экстренной вакцинации).

Fig. 7. The number of cases on the 60th day (scenario without emergency vaccination).

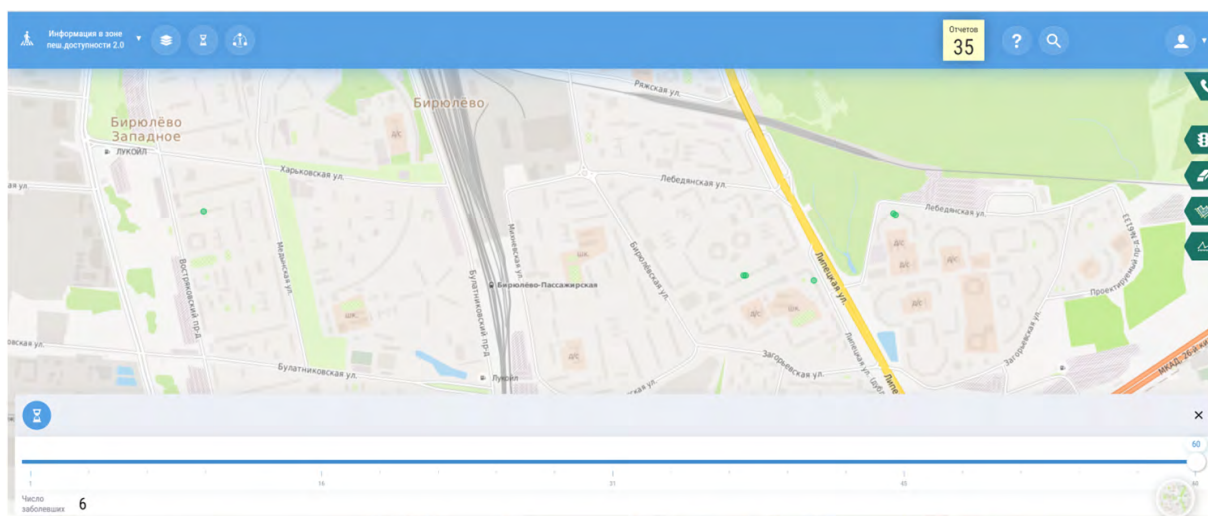


Рис. 8. Количество больных лиц (6 человек) на 60-й день (сценарий с экстренной вакцинацией).

Fig. 8. The number of cases (6 persons) on the 60th day (scenario with emergency vaccination).

внесения данных об охвате экстренной вакцинацией контактных лиц (по адресу первого выявленного инфицированного агента) производится пересчёт модели. На **рис. 8** представлен результат расчёта (по сценарию с экстренной вакцинацией) количества больных корью — на 60-й день выявлено 6 человек. Таким образом, в приведённом примере экстренная вакцинация контактных лиц после выявления первого больного позволила предотвратить 27 случаев заболевания за наблюдаемый период (60 дней).

Используя слои, функционал Геоплатформы и дополнительно внедрённые в неё модули, пользователь может открыть заранее подготовленные расчёты или выполнить симуляцию в онлайн-режиме, внести название нового расчёта и настроить начальные условия (выбрать дату расчёта, результаты будут различаться по начальной дате, выпавшей

на будние или выходные дни, настроить количество дней симуляции, определить долю восприимчивых лиц, выбрать первого/первых инфицированных лиц по конкретному адресу/адресам). Список лиц, проживающих в доме по конкретному адресу, разделен по семьям и содержит данные (симулированные программой) о возрасте и сфере занятости агентов. После завершения симуляции можно визуализировать результат расчёта (оперативный прогноз на несколько недель вперед) динамики заболеваемости корью.

В конце симуляции формируется итоговый результат в виде отчёта, в котором содержится список всех инфицированных, с историей болезни каждого агента. В историю болезни входят все стадии-состояния протекания инфекционного процесса кори, что позволяет проследить динамику инфекционного процесса у конкретного агента: идентифициро-

вать, на какой день появились симптомы, сколько длился инкубационный период и когда выздоровел. Результаты сохраняются в базе данных с возможностью их визуализации на карте.

Таким образом, использование агентной модели совместно с Геоплатформой позволяет моделировать и визуализировать на карте распространение инфекционных заболеваний с учётом проведения общепринятых противоэпидемических мер в отношении инфицированных и контактных лиц (изоляция, экстренная вакцинация).

В перспективе дальнейшей разработки существует возможность расчёта с помощью модели вклада конкретных административных воздействий на динамику заболеваемости, например учёт в отдельности: ограничения работы транспорта или торговых и развлекательных объектов, промышленных предприятий, закрытия школьных и дошкольных учреждений и др., а также оценить необходимую продолжительность таких мер. Возможности разработанного инструмента позволяют проводить анализ и оценку отдельных мер противодействия эпидемии на уровне города, субъекта федерации, страны в целом.

Заключение

Сотрудниками НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи и компании «Геоинтеллект» разработаны программные инструменты, которые в перспективе могут быть полезным и актуальным дополнением в повседневной работе специалистов, способствовать совершенствованию и углублению практических навыков и умений в соответствии с видами и задачами профессиональной деятельности.

В статье мы ограничились описанием лишь небольшой части возможностей платформы и разработанной агентной модели распространения в мегаполисе инфекции с воздушно-капельным механизмом передачи (на примере распространения кори). В перечень задач первого и второго направления включены эпидемиологические ситуации, решаемые врачом-эпидемиологом в практической работе, и предложены инструменты для их решения. С помощью интегрированной в платформу модели расширяются возможности для анализа и прогноза распространения заболеваний (в том числе COVID-19), поиска оптимальных противоэпидемических мероприятий в городе, а также формирования отчётов для помощи в принятии управленческих решений.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Акимкин В.Г. Резолюция Всероссийской научно-практической интернет-конференции с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность — 2020» (Москва, 6–8 октября 2020 г.). *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(6): 610–12.
- Симонова Е.Г. *Профессиональная подготовка специалистов в системе управления эпидемическим процессом*. М.: Спутник+; 2010.
- Heesterbeek H., Anderson R., Andreasen V., Bansal S., De Angelis D., Dye C., et al. Modeling infectious disease dynamics in the complex landscape of global health. *Science*. 2015; 347(6227): aaa4339. <https://doi.org/10.1126/science.aaa4339>
- Thompson K.M. Evolution and use of dynamic transmission models for measles and rubella risk and policy analysis. *Risk Anal*. 2016; 36(7): 1383–1403. <http://doi.org/10.1111/risa.12637>
- Беляков В.Д., Яфаев Р.Х. *Эпидемиология*. М.: Медицина; 1989.
- Clarke K.C., McLafferty S.L., Tempalski B.J. On epidemiology and geographic information systems: a review and discussion of future directions. *Emerg. Infect. Dis*. 1996; 2(2): 85–92. <https://doi.org/10.3201/eid0202.960202>
- Асатрян М.Н., Салман Э.Р., Семененко Т.А. Анализ закономерностей и прогнозирование процессов распространения гепатита В на территориях федеральных округов РФ. В кн.: *Сборник трудов конференции «Геоинформационные системы в здравоохранении РФ: данные, аналитика, решения»*. СПб.; 2016: 75–82.
- Струков Д.Р., Чигинева А.С. Пространственный метод анализа доступности медицинской помощи на примере Санкт-Петербурга. *Геоматика*. 2014; (3): 51–5.
- Location Intelligence — Аналитика, основанная на местоположении. Available at: <http://sergeytkhomirov.ru/location-intelligence-analitika-osnovannaya-na-mestopolo/>
- Герхардт Э. Информационные системы и базы данных. *Вестник НГУЭУ*. 2015; (4): 309–16. Available at: <https://www.sibran.ru/upload/iblock/c00/c00c48e637002713d59b000d2eb37c6.pdf>
- Салман Э.Р., Асатрян М.Н., Семененко Т.А. Анализ и прогноз развития водных вспышек гепатита А техногенного характера на территории Российской Федерации. В кн.: *Сборник трудов конференции «Геоинформационные системы в здравоохранении РФ: данные, аналитика, решения»*. СПб.; 2016: 65–8.
- Боев Б.В. Модель развития эпидемии гриппа А(H1N1) в России в сезон 2009–2010 годов. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2010; (1): 52–8.
- Боев Б.В. *Прогнозно-аналитические модели эпидемий (оценка последствий техногенных аварий и природных катастроф)*. М.; 2005. Available at: <https://www.armscontrol.ru/course/lectures05a/bvb050324.pdf>
- Burke D.S. Appendix E. Computational modeling and simulation of epidemic infectious diseases. In: Lederberg J., ed. *Microbial Threats to Health: Emergence, Detection, and Response*. Washington; 2003. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK221490>
- Салман Э.Р., Коренберг Э.И., Асатрян М.Н. Моделирование эпизоотического процесса облигатнотрансмиссивных инфекций, передающихся иксодовыми клещами. *Успехи современной биологии*. 2018; 138(6): 583–601. <https://doi.org/10.7868/S004213241806006>
- Das T.K., Savachkin A.A., Zhu Y. A large-scale simulation model of pandemic influenza outbreaks for development of dynamic mitigation strategies. *IIE Transactions*. 2008; 40(9): 893–905. <https://doi.org/10.1080/07408170802165856>
- DeAngelis D.L., Diaz S.G. Decision-making in agent-based modeling: a current review and future prospectus. Review article. *Front. Ecol. Evol*. 2019; 6: 237. <https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00237>
- Tracy M., Cerdá M., Keyes K.M. Agent-based modeling in public health: current applications and future directions. *Annu. Rev. Public Health*. 2018; 39: 77–94. <https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth040617-014317>

19. Huntera E., Mac Nameeb B., Kellehera J.D. A taxonomy for agent-based models in human infectious disease epidemiology. *J. Artif. Soc. Soc. Simul.* 2017; 20(3): 2. <https://doi.org/10.18564/jasss.3414>
20. Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Алешкин В.А. *Корь в России: проблемы ликвидации*. М.: Династия; 2017.
21. Ноздрачева А.В., Семенов Т.А., Асатрян М.Н., Шмыр И.С., Ершов И.Ф., Соловьев Д.В. и др. Иммунологическая восприимчивость населения мегаполиса к кори на этапе ее элиминации. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2019; 18(2): 18–26. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-2-18-26>
- REFERENCES
1. Akimkin V.G. Resolution of the all-Russian scientific and practical internet conference with international participation «Modern immunization: challenges, opportunities, prospects» (Moscow, October 19–20, 2020). *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(6): 610–12. (in Russian)
2. Simonova E.G. *Professional Training of Specialists in the Epidemic Process Management System [Professional'naya podgotovka spetsialistov v sisteme upravleniya epidemicheskim protsessom]*. Moscow: Sputnik+; 2010. (in Russian)
3. Heesterbeek H., Anderson R., Andreasen V., Bansal S., De Angelis D., Dye C., et al. Modeling infectious disease dynamics in the complex landscape of global health. *Science*. 2015; 347(6227): aaa4339. <https://doi.org/10.1126/science.aaa4339>
4. Thompson K.M. Evolution and use of dynamic transmission models for measles and rubella risk and policy analysis. *Risk Anal.* 2016; 36(7): 1383–1403. <http://doi.org/10.1111/risa.12637>
5. Belyakov V.D., Yafaev R.Kh. *Epidemiology [Epidemiologiya]*. Moscow: Meditsina; 1989. (in Russian)
6. Clarke K.C., McLafferty S.L., Tempalski B.J. On epidemiology and geographic information systems: a review and discussion of future directions. *Emerg. Infect. Dis.* 1996; 2(2): 85–92. <https://doi.org/10.3201/eid0202.960202>
7. Asatryan M.N., Salman E.R., Semenenko T.A. Analysis of patterns and forecasting of the spread of hepatitis B in the territories of the federal districts of the Russian Federation. In: *Proceedings of the Conference «Geoinformation Systems in Healthcare of the Russian Federation: Data, Analytics, Solutions» [Sbornik trudov konferentsii «Geoinformatsionnye sistemy v zdravookhraneni RF: dannye, analitika, resheniya»]*. St. Petersburg; 2016: 75–82. (in Russian)
8. Strukov D.R., Chigineva A.S. The spatial method of analysis of the health care access by the example of St. Petersburg. *Geomatika*. 2014; (3): 51–5. (in Russian)
9. Location Intelligence — Location-based analytics. Available at: <http://sergeytkhomirov.ru/location-intelligence-analitika-osnovannaya-na-mestop/> (in Russian)
10. Gerhardt E. Information systems and databases. *Vestnik NGUEU*. 2015; (4): 309–16.
- Available at: <https://www.sibran.ru/upload/iblock/c00/c00c48e637002713d59b0000d2eb37c6.pdf> (in Russian)
11. Salman E.R., Asatryan M.N., Semenenko T.A. Analysis and forecast of the development of waterborne outbreaks of hepatitis A of a technogenic nature in the territory of the Russian Federation. In: *Proceedings of the Conference «Geoinformation Systems in Healthcare of the Russian Federation: Data, Analytics, Solutions» [Sbornik trudov konferentsii «Geoinformatsionnye sistemy v zdravookhraneni RF: dannye, analitika, resheniya»]*. St. Petersburg; 2016: 65–8. (in Russian)
12. Boev B.V. Modeling of the epidemic of influenza A(H1N1) in Russia season 2009–2010. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2010; (1): 52–8. (in Russian)
13. Boev B.V. *Predictive and Analytical Models of Epidemics (Assessment of the Consequences of Man-Made Accidents and Natural Disasters) [Prognozno-analiticheskie modeli epidemiy (otsenka posledstviy tekhnogennykh avariyy i prirodnykh katastrof)]*. Lecture. Moscow; 2005. Available at: <https://www.arm-scontrol.ru/course/lectures05a/bvb050324.pdf> (in Russian)
14. Burke D.S. Appendix E. Computational modeling and simulation of epidemic infectious diseases. In: Lederberg J., ed. *Microbial Threats to Health: Emergence, Detection, and Response*. Washington; 2003. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK221490>
15. Salman E.R., Korenberg E.I., Asatryan M.N. Modeling of epizootic process in obligate vector-borne infections transmitted by ticks. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2018, 138(6): 583–601. <https://doi.org/10.7868/S004213241806006> (in Russian)
16. Das T.K., Savachkin A.A., Zhu Y. A large-scale simulation model of pandemic influenza outbreaks for development of dynamic mitigation strategies. *IIE Transactions*. 2008; 40(9): 893–905. <https://doi.org/10.1080/07408170802165856>
17. DeAngelis D.L., Diaz S.G. Decision-making in agent-based modeling: a current review and future prospectus. Review article. *Front. Ecol. Evol.* 2019; 6: 237. <https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00237>
18. Tracy M., Cerdá M., Keyes K.M. Agent-based modeling in public health: current applications and future directions. *Annu. Rev. Public Health*. 2018; 39: 77–94. <https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth040617-014317>
19. Huntera E., Mac Nameeb B., Kellehera J.D. A taxonomy for agent-based models in human infectious disease epidemiology. *J. Artif. Soc. Soc. Simul.* 2017; 20(3): 2. <https://doi.org/10.18564/jasss.3414>
20. Onishchenko G. G., Popova A. Yu., Aleshkin V.A. *Measles in Russia: Problems of Elimination [Kor' v Rossii: problemy likvidatsii]*. Moscow: Dinastia; 2017.
21. Nozdracheva A.V., Semenenko T.A., Asatryan M.N., Shmyr I.S., Ershov I.F., Solov'ev D.V., et al. Immunological susceptibility of metropolis population to measles in its elimination stage. *Epidemiologiya i Vaksino profilaktika*. 2019; 18(2): 18–26. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-2-18-26> (in Russian)

Информация об авторах

Асатрян Марина Норайровна[✉] — к.м.н., с.н.с. отдела эпидемиологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, masatryan@gamaleya.org, <https://orcid.org/0000-0001-6273-8615>

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

Струков Денис Раймондович — к.т.н., генеральный директор Центра пространственных исследований, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0381-8230>

Шмыр Илья Сергеевич — н.с. отдела эпидемиологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-00028514-5174>

Information about the authors

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

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

Denis R. Strukov — Cand. Sci. (Tech.), General Director, Center for Spatial Researches, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0381-8230>

Ilya S. Shmyr — researcher, Department of epidemiology, N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology, <https://orcid.org/0000-0002-8514-5174>

Вехов Алексей Олегович — ведущий IT-разработчик Центра пространственных исследований, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3253-9812>

Ершов Иван Феликсович — н.с. отдела эпидемиологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3333-5347>

Лабодин Андрей Викторович — руководитель IT-департамента Центра пространственных исследований, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4122-1833>

Ноздрачева Анна Валерьевна — н.с. отдела эпидемиологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/00000002-8521-1741>

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

Народицкий Борис Савельевич — д.б.н., проф., зам. директора Института вирусологии им. Д.И. Ивановского НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи по научной работе, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5522-8238>

Пронин Александр Васильевич — д.б.н., проф., зам. директора НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи по научной работе, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5266-9783>

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 16.02.2021;
принята к публикации 30.05.2021;
опубликована 20.08.2021

Aleksey O. Vekhov — leading IT developer, Center for Spatial Researches, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3253-9812>

Ivan F. Ershov — researcher, Department of epidemiology, N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology, <https://orcid.org/0000-0002-3333-5347>

Andrey V. Labodin — head of IT department, Center for Spatial Researches, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4122-1833>

Anna V. Nozdracheva — researcher, Department of epidemiology, N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/00000002-8521-1741>

Tatiana A. Semenenko — D. Sci. (Med.), professor, Academician of the Russian Academy of Natural Sciences, Head, Epidemiology department, N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology; professor, Department of infectiology and virology, Sechenov University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/00000002-6686-9011>.

Boris S. Naroditsky — D. Sci. (Biol.), professor, Deputy Director for research divisions, D.I. Ivanovsky Institute of Virology, N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5522-8238>

Alexander V. Pronin — D. Sci. (Biol.), professor, Deputy Director for research, N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5266-9783>

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 16.02.2021;
accepted for publication 30.05.2021;
published 20.08.2021

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-108>



Сравнительная оценка гидролизатов как основы при конструировании питательной среды для культивирования *Listeria monocytogenes*

Хаптанова Н.М.¹, Остяк А.С.¹, Лукьянова С.В.^{1✉}, Кузнецов В.И.¹,
Андреевская Н.М.¹, Адамович С.Н.², Ушаков И.А.², Юденич С.В.¹, Балахонов С.В.¹

¹Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока, Иркутск, Россия;

²Иркутский институт химии имени А.Е. Фаворского, Иркутск, Россия

Аннотация

Цель работы — провести сравнительную оценку панкреатических гидролизатов, полученных из рыбы и кальмаров, для подбора оптимальной питательной среды для культивирования *Listeria monocytogenes*.

Материалы и методы. В работе использовали следующее сырье: сельдь тихоокеанскую (*Clupea pallasii*), минтай (*Gadus chalcogrammus*), плотву сибирскую (*Rutilus rutilus lacustris*) — сорогу, кальмар европейский (*Loligo vulgaris*). Сырье подвергали ферментативному гидролизу с помощью поджелудочной железы (по Хоттингеру). Проводили исследование физико-химических свойств панкреатических гидролизатов (аминный азот, кислотность, аминокислотный состав). Специфическую активность питательных сред при культивировании тест-штамма *L. monocytogenes* 766 оценивали комплексом микробиологических методов.

Результаты и обсуждение. Наибольшее содержание аминного азота в конце ферментативного гидролиза выявлено в панкреатическом гидролизате сороги (6%), кислотность гидролизата сороги оставалась стабильной с 6-х до 13-х суток процесса гидролиза (рН 7,2). Панкреатические гидролизаты содержали ряд аминокислот, которые являются наиболее существенными для роста листерий.

При оценке биологических свойств питательных сред, приготовленных на основе полученных гидролизатов, наилучшие результаты отмечены у питательной среды на основе панкреатического гидролизата сороги. При культивировании *L. monocytogenes* 766 установлено, что тест-штамм сохранял морфологические и культуральные свойства и не проявлял признаков диссоциации.

Заключение. Результаты исследований показали, что панкреатический гидролизат сороги является перспективной белковой основой для конструирования экспериментальной листериозной среды.

Ключевые слова: *Listeria monocytogenes*, листериоз, панкреатический гидролизат, питательная среда, биологические свойства

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Иркутской области в рамках научного проекта № 20-43-380001.

Для цитирования: Хаптанова Н.М., Остяк А.С., Лукьянова С.В., Кузнецов В.И., Андреевская Н.М., Адамович С.Н., Ушаков И.А., Юденич С.В., Балахонов С.В. Сравнительная оценка гидролизатов как основы при конструировании питательной среды для культивирования *Listeria monocytogenes*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2021;98(4):481–485.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-108>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-108>

Comparative evaluation of hydrolysates as a basis for the construction of a nutrient medium for the cultivation of *Listeria monocytogenes*

Natal'ya M. Khaptanova¹, Aleksandr S. Ostyak¹, Svetlana V. Lukyanova^{1✉},
Vladimir I. Kuznetsov¹, Nina M. Andreevskaya¹, Sergey N. Adamovich²,
Igor A. Ushakov², Sergei V. Yudenich¹, Sergei V. Balakhonov¹

¹Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russia;

²Irkutsk A.E. Favorsky Institute of Chemistry, Irkutsk, Russia

Abstract

The **objective** is to perform a comparative evaluation of the pancreatic hydrolysates prepared from fish and squid to determine the optimal culture medium for *Listeria monocytogenes*.

Materials and methods. The following raw materials were used in the study: Pacific Herring (*Clupea pallasii*), Alaska Pollock (*Gadus chalcogrammus*), Common Roach (*Rutilus rutilus lacustris*), European Squid (*Loligo vulgaris*). The raw materials were subjected to enzymatic hydrolysis using the pancreas (according to Hottinger). A study of the physicochemical properties of pancreatic hydrolysates (content of free amino nitrogen (FAN), acidity of fish hydrolysates, the amino acid composition) was carried out. The specific activity of nutrient media during the cultivation of the test strain *L. monocytogenes* 766 was assessed by a complex of microbiological methods.

Results and discussion. The highest content of FAN at the end of enzymatic hydrolysis was observed in the pancreatic hydrolysate of the common roach (6%), the acidity of the hydrolysate remained stable from 6th to 13th day of the hydrolysis process (pH 7.2). Pancreatic hydrolysate of the common roach contained a number of amino acids that are most essential for the growth of *Listeria*.

An assessment of the biological properties of nutrient media prepared on the basis of the obtained hydrolysates demonstrated that the best results in terms of sensitivity and germination of *L. monocytogenes* 766 showed a nutrient medium based on the pancreatic hydrolysate of the common roach. During the cultivation of *L. monocytogenes* 766 the test strain retained its morphological and cultural properties and did not show signs of dissociation.

Conclusion. The research results have shown that the pancreatic hydrolysate of the common roach is a promising protein basis for the construction of an experimental environment for *Listeria*.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, pancreatic hydrolysate, nutrient medium, biological properties

Funding. The reported study was funded by RFBR and the Government of the Irkutsk Region according to the research project 20-43-380001.

For citation: Khaptanova N.M., Ostyak A.S., Lukyanova S.V., Kuznetsov V.I., Andreevskaya N.M., Adamovich S.N., Ushakov I.A., Yudenich S.V., Balakhonov S.V. Comparative evaluation of hydrolysates as a basis for the construction of a nutrient medium for the cultivation of *Listeria monocytogenes*. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(4):481–485.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-108>

Введение

При проведении бактериологических исследований, а также для производства медицинских изделий для диагностики *in vitro* требуются качественные питательные среды (ПС), обеспечивающие потребности роста *Listeria monocytogenes*. К наиболее часто применяемым компонентам микробиологических сред относятся питательные основы животного и растительного происхождения [1–3]. В настоящее время мясные основы в большинстве случаев уступили место более рентабельному сырью — рыбе и продуктам ее переработки. Так, в производстве отечественных ПС используют гидролизат рыбной муки, в связи с этим целесообразен поиск альтернативных источников сырья [4–6].

Цель — провести сравнительную оценку панкреатических гидролизатов (ПГ), полученных из рыбы и кальмаров, для подбора оптимальной ПС для культивирования *L. monocytogenes*.

Материалы и методы

Для получения ПГ в качестве исходного сырья использовали сельдь тихоокеанскую (*Clupea pallasii*), минтай (*Gadus chalcogrammus*), плотву сибирскую (*Rutilus rutilus lacustris*) — сорогу, кальмара европейского (*Loligo vulgaris*). В качестве фер-

мента — поджелудочную железу крупного рогатого скота. ПГ готовили согласно методике [7].

Содержание аминного азота определяли формальным титрованием, значение рН гидролизатов исследовали потенциометрическим методом по МУК 4.2.2316-08¹.

Определение состава гидролизатов 1–4 проводили методом ¹H, ¹³C, ¹⁵N ЯМР-спектроскопии. Спектры ЯМР ¹H (400,1 МГц), ¹³C (100,6 МГц), ¹⁵N (40,5 МГц) записывали на спектрометрах «Bruker DPX400» (¹³C) и «Bruker AV400» (¹H и ²M) без использования дейтерированных растворителей.

Определение биологических свойств проводили комплексом микробиологических методов в соответствии с МУК 4.2.2316-08. В работе использовали тест-штамм *L. monocytogenes* 766 из коллекции патогенных бактерий Иркутского научно-исследовательского противочумного института.

Статистическую обработку результатов исследования проводили путем вычисления средней арифметической (*M*) и средней ошибки средней арифметической (*m*). При оценке достоверности различий сравниваемых данных за уровень значимости принимали *p* < 0,05.

¹ Методы контроля бактериологических питательных сред. Методические указания. МУК 4.2.2316-08. М., 2008. 64 с.

Биологические свойства тест-штамма *L. monocytogenes* 766, выращенного на плотных ПС с различными вариантами питательных основ

Biological properties of the test strain *L. monocytogenes* 766 cultured on solid nutrient media with different variants of nutrient bases

Питательная основа Nutrient base	Показатель прорастания микроорганизмов*, % ($M \pm m$) Index of emergence of microorganisms*, % ($M \pm m$)	Чувствительность (выросло колоний при посеве 10 м.к.) ($M \pm m$) Sensitivity (grown colonies when 10 microbial cells were inoculated) ($M \pm m$)	Диаметр колоний, мм Colony diameter, mm	Скорость роста, ч Growth rate, h
Сельдь тихоокеанская Pacific Herring (<i>Clupea pallasii</i>)	—	—	—	18
	100,0 ± 1,1	6,0 ± 1,1	1,0–1,2	24
	100,0 ± 1,8	7,0 ± 1,1	3,0–3,5	48
Минтай Alaska Pollock (<i>Gadus chalcogrammus</i>)	—	—	—	18
	—	—	1,0	24
	100,0 ± 1,4	8,0 ± 0,4	2,5–3,0	48
Сорога Common Roach (<i>Rutilus rutilus lacustris</i>)	—	—	—	18
	110,0 ± 1,1	9,0 ± 0,4	1,0–1,5	24
	112,0 ± 1,6	10,0 ± 0,4	3,0–4,0	48
Кальмар европейский European Squid (<i>Loligo vulgaris</i>)	—	—	—	18
	—	—	< 1,0	24
	99,0 ± 1,8	7,0 ± 1,1	2,0–2,5	48

Примечание. *Показатель прорастания микробных клеток — отношение среднего числа колоний, образовавшихся на испытываемой среде, к среднему числу колоний на контрольной среде, выраженное в процентах; «—» — подсчет колоний не проводился.

Note. *The index of the emergence of microbial cells is the ratio of the average number of colonies formed on the test medium to the average number of colonies on the control medium, expressed as a percentage; (—) — no colonies were counted.

Результаты и обсуждение

В процессе приготовления ПГ смешивали фарш из исходного сырья, бульон, добавляли поджелудочную железу крупного рогатого скота и хлороформ. Потеря в массе от исходного сырья составила 56% у кальмаров и 26–38% у рыбы.

Динамику ферментативного процесса определяли по нарастанию аминного азота. Во всех полученных ПГ наблюдали количественное изменение содержания аминного азота в течение 13 сут (в среднем до $5,7 \pm 0,2\%$). Содержание 1,5–6,0% аминного азота в гидролизате говорит о высокой степени расщепления белка до аминокислот и пептидов. Прекращение нарастания аминного азота свидетельствует об окончании ферментативного процесса.

Наибольшее содержание аминного азота в конце гидролиза выявлено в ПГ сороги — 6%. Этот показатель оставался стабильным с 6-х до 13-х суток процесса гидролиза, что свидетельствует о более быстрой фазе гидролиза в этом образце. Наименьшие показания аминного азота отмечены в ПГ минтая (5,4%). Во всех образцах степень гидролиза наиболее интенсивно увеличивалась в течение первых 3 сут и на 7-е сутки (в среднем на $0,9 \pm 0,2\%$ и $1,2 \pm 0,2\%$ соответственно) по сравнению с 1-ми сутками ферментализации, а в течение последующих 6 сут отмечалась стабилизация значений степени гидролиза (в среднем увеличение на 0,2%) по сравнению с 7-ми сутками.

Водородный показатель (рН) исследуемых проб в процессе гидролиза на 1-е сутки оставался нейтральным, а затем, на протяжении последующих 13 сут, изменялся в слабощелочную сторону (в среднем от $6,9 \pm 0,1$ до $7,4 \pm 0,2$).

Значения рН в гидролизате сороги оставались стабильным с 6-х до 13-х суток процесса гидролиза (рН 7,2), что согласуется и с показателями аминного азота. В гидролизате сельди значения рН с 7-х по 13-е сутки были также близки к нейтральным значениям, а в гидролизатах кальмара и минтая, напротив, после 3 сут гидролиза стремились в слабощелочную сторону (от 7,4 до 7,7), что, вероятно всего, связано с особенностями исходного сырья.

Для оценки качественного состава питательных основ был использован метод ЯМР-спектроскопии. Согласно данным [8–10] и спектральной базы органических соединений National Institute of Advanced Industrial Science and Technology², эти сигналы соответствуют группам CHNH_2 , CH_2CHNH_2 аминокислот. В области спектра 124–125 м.д. для всех образцов присутствуют наборы сигналов, характерные для замещенного ароматического кольца.

В области 174–188 м.д. наблюдаются наборы сигналов карбоксильных групп COOH , принадлежащих нескольким аминокислотам. Анализ 2М спектров ЯМР свидетельствует о наличии в образцах

² URL: www.aist.go.jp; www.acdlabs.com

свободных аминокислот (аланин, валин, треонин, аргинин, лизин, лейцин, метионин, фенилаланин, глицин). Доля гистидина, тирозина, триптофана составляет 5%. В виде примесей в ПГ сельди присутствует глицерин (73,1 и 63,5 м.д.), а в ПГ минтая и кальмара — диметилкарбамид (3,3 м.д. в ^1H -ЯМР и 60 и 157 м.д. в ^{13}C). Наиболее свободным от примесей был ПГ сороги. Сигналы в спектрах ^{15}N -ЯМР в области от -330 до -352 м.д. соответствуют свободным NH_2 -группам.

Таким образом, из исследуемых аминокислот в ПГ выявлены 5 (лейцин, аргинин, метионин, валин, гистидин), которые являются наиболее важными для роста листерий и стимулирующими его, а 6 (триптофан, лизин, фенилаланин, глицин, аланин, треонин) также соответствуют питательным потребностям микроорганизма.

Из полученных лиофилизированных гидролизатов сконструировали 4 плотные ПС, в состав которых входили (г/л): NaCl — 3,0; агар микробиологический — 9,0; глюкоза — 10,0; карбонат натрия — 0,7; pH среды $7,3 \pm 0,2$.

Изучены биологические свойства приготовленных ПС по показателям прорастания микроорганизмов, чувствительности ПС, скорости роста микроорганизмов и стабильности культуры (таблица).

Отчётливый видимый невооруженным глазом рост культуры *L. monocytogenes* 766 обнаружен через 18 ч инкубации на ПС на основе ПГ сельди и сороги, у других сред определен только через 24 ч. В ПС на основе сельди и сороги через 24 ч инкубации тест-штамма *L. monocytogenes* 766 отмечали типичный рост колоний в S-форме, достаточный для визуального подсчета ($d = 1,0\text{--}1,5$ мм). По сравнению с этим ПС на основе минтая и кальмара обеспечивали типичный рост культуры только через 48 ч инкубации.

Данные о количестве, диаметре и морфологии колоний *L. monocytogenes* 766 через 48 ч инкубации при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ показывают, что по количеству выросших колоний *L. monocytogenes* 766 изучаемые ПС отличались между собой незначительно, за исключением ПС, включающей ПГ сороги, которая превосходила ПС на основе сельди, минтая и кальмара ($p < 0,05$). Также наблюдалось увеличение размера колоний листерий (3–4 мм) по сравнению с другими ПС. При этом тест-штамм *L. monocytogenes* 766 сохранял типичные культурально-морфологические и биохимические свойства.

Заключение

Таким образом, показано, что ПС на основе ПГ сороги обладает удовлетворительными ростовыми свойствами, достигнутыми за счет сочетанного использования оптимальных концентраций питательной основы и компонентов, стимулирующих рост листерий, что в совокупности обеспечивает в мини-

мальные сроки значительное накопление бактериальной массы листерий.

Благодарность / Acknowledgments

Определение состава гидролизатов проводили с использованием оборудования Байкальского аналитического центра коллективного пользования СО РАН. / The main results were obtained using the equipment of the Baikal Analytical Center for Collective Use of the SB RAS.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Ковтун Ю.С., Курилова А.А., Таран Т.В., Катунина Л.С., Чурикова Н.В. Сравнительная оценка потенциальных белковых основ микробиологических сред. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2014; (3): 92–5.
2. Шепелин А.П. Современное состояние и тенденции в разработке, производстве и применении питательных сред. *Бактериология*. 2016; 1(1): 42–7. <https://doi.org/10.20953/2500-1027-2016-1-42-47>
3. Сизоненко М.Н., Тимченко Л.Д., Ржепаковский И.В., Катунина Л.С. Влияние биологически активных субстанций на основе эмбриональных тканей перепелов на биологические свойства *Listeria monocytogenes*. *Ветеринарная патология*. 2017; (1): 34–9.
4. Поляк М.С., Сухаревич В.И., Сухаревич М.Э. *Питательные среды для медицинской и санитарной микробиологии*. СПб.: ЭЛБИ-СПб.; 2008.
5. Насыпаева Е.Н., Лещенко А.А. Сравнительный анализ способов приготовления питательных основ из продуктов переработки молока. В кн.: *Всероссийская ежегодная научно-практическая конференция «Общество, наука, инновации»*. Киров; 2014: 154–5.
6. Шепелин А.П., Шолохова Л.П., Марчихина И.И., Полосенко О.В. Панкреатический гидролизат рыбной кормовой муки – полноценная белковая основа питательных сред. В кн.: *Материалы IV Национального конгресса бактериологов и Международного симпозиума «Микроорганизмы и биосфера "Microbios-2018"»*. Омск; 2018: 82–3.
7. Дятлов И.А., Кутырев В.В., Храмов М.В. *Питательные среды для выделения, культивирования и идентификации возбудителей особо опасных инфекций бактериальной природы*. М.; 2012.
8. Кузьмина Н.Е., Моисеев С.В., Крылов В.И., Кутин А.А., Яшкир В.А., Меркулов В.А. Валидация методики определения аминокислотного состава фармацевтической субстанции «Глатирамера ацетат» методом ЯМР спектроскопии. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2017; 7(3): 175–81.
9. Simmler C., Napolitano J.G., McAlpine J.B., Chen S.N., Pauli G.F. Universal quantitative NMR analysis of complex natural samples. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2014; 25: 51–9. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.08.004>
10. Fan T.W., Lane A.N. Applications of NMR spectroscopy to systems biochemistry. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 2016; 92–93: 18–53. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2016.01.005>

REFERENCES

1. Kovtun Yu.S., Kurilova A.A., Taran T.V., Katunina L.S., Churikova N.V. Comparative assessment of prospective protein bases for microbiological media. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2014; (3): 92–5. (in Russian)
2. Shepelin A.P. Nutrient media: current status & trends in design, production and application. *Bakteriologiya*. 2016; 1(1): 42–7. <https://doi.org/10.20953/2500-1027-2016-1-42-47> (in Russian)

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

3. Sizonenko M.N., Timchenko L.D., Rzhepakovskiy I.V., Katunina L.S. Influence of biologically active substances on the basis of embryonic tissues of derivatives on the biological properties of *Listeria monocytogenes*. *Veterinarnaya patologiya*. 2017; (1): 34–9. (in Russian)
4. Polyak M.S., Sukharevich V.I., Sukharevich M.E. *Nutrient Media for Medical and Sanitary Microbiology [Pital'nye sredy dlya meditsinskoy i sanitarnoy mikrobiologii]*. St. Petersburg: ELBI-SPb.; 2008. (in Russian)
5. Nasyraeva E.N., Leshchenko A.A. Comparative analysis of methods for preparing nutritional bases from milk processing products. In: *All-Russian Annual Scientific and Practical Conference «Society, Science, Innovations» [Vserossiyskaya ezhegodnaya nauchno-prakticheskaya konferentsiya «Obshchestvo, nauka, innovatsii»]*. Kirov; 2014: 154–5. (in Russian)
6. Shepelin A.P., Sholokhova L.P., Marchikhina I.I., Polosenko O.V. Pancreatic hydrolyzed fish feed meal – a complete protein base of nutrient media. In: *Proceedings of the IV National Congress of Bacteriologists and the International Symposium «Microorganisms and the Biosphere "Microbios-2018"» [Materialy IV Natsional'nogo kongressa bakteriologov i Mezhdunarodnogo simpoziuma «Mikroorganizmy i biosfera "Microbios-2018"»]*. Omsk; 2018: 82–3. (in Russian)
7. Dyatlov I.A., Kut'yev V.V., Khramov M.V. *Nutrient Media for the Isolation, Cultivation, and Identification of Pathogens of Extremely Dangerous Bacterial Infections [Pital'nye sredy dlya vydeleniya, kul'tivirovaniya i identifikatsii vozбудiteley osobo opasnykh infektsiy bakterial'noy prirody]*. Moscow; 2012. (in Russian)
8. Kuz'mina N.E., Moiseev S.V., Krylov V.I., Kutin A.A., Yashkir V.A., Merkulov V.A. Validation of the procedure for determination of amino acids composition of glutiramer acetate by ¹³C NMR spectroscopy. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya*. 2017; 7(3): 175–81. (in Russian)
9. Simmler C., Napolitano J.G., McAlpine J.B., Chen S.N., Pauli G.F. Universal quantitative NMR analysis of complex natural samples. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2014; 25: 51–9. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.08.004>
10. Fan T.W., Lane A.N. Applications of NMR spectroscopy to systems biochemistry. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 2016; 92-93: 18–53. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2016.01.005>

Информация об авторах

Хаптанова Наталья Маркеловна — м.н.с. лаб. питательных сред Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока, Иркутск, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8520-4720>

Остяк Александр Сергеевич — н.с. отд. биологического и технологического контроля Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока, Иркутск, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9391-6779>

Лукьянова Светлана Владимировна — к.б.н., н.с. лаб. питательных сред Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока, Иркутск, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3687-1273>

Кузнецов Владимир Ильич — к.б.н., зав. лаб. питательных сред Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока, Иркутск, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2089-1771>

Андреевская Нина Михайловна — к.б.н., с.н.с. Научно-производственного отдела Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока, Иркутск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8051-1809>

Адамович Сергей Николаевич — д.х.н., в.н.с. Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского, Иркутск, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1276-924X>

Ушаков Игорь Алексеевич — к.х.н., с.н.с. Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского, Иркутск, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0176-1699>

Юденич Сергей Валентинович — с.н.с. научно-производственного отдела Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока, Иркутск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6948-7633>

Балахонov Сергей Владимирович — д.м.н., проф., директор Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока, Иркутск, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4201-5828>

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.

Information about the authors

Natalya M. Khaptanova — junior researcher, Laboratory of cultural medium, Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8520-4720>

Aleksandr S. Ostyak — researcher, Department of biological and technological control, Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9391-6779>

Svetlana V. Lukyanova — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Laboratory of cultural medium, Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russia, svetalukyan@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3687-1273>

Vladimir I. Kuznetsov — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of cultural medium, Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2089-1771>

Nina M. Andreevskaya — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Research and production department, Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8051-1809>

Sergey N. Adamovich — D. Sci. (Chem.), leading researcher, A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry, Irkutsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1276-924X>

Igor A. Ushakov — Cand. Sci. (Chem.), senior researcher, A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry, Irkutsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0176-1699>

Sergei V. Yudenich — senior researcher, Research and production department, Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6948-7633>

Sergey V. Balakhonov — D. Sci. (Med.), Prof., Director, Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4201-5828>

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 03.12.2020;
accepted for publication 26.02.2021;
published 20.03.2021

ЮБИЛЕИ



Зинаида Виссарионовна Ермольева — великий советский учёный-микробиолог и эпидемиолог

*«Кто посвятит свою жизнь служению науке,
того имя и после смерти будет бессмертным»*

Алишер Навои

В 2021 г. исполняется 100 лет с начала научной деятельности в Ростовском бактериологическом институте выдающегося советского микробиолога, эпидемиолога, академика РАМН Зинаиды Виссарионовны Ермольевой.

Этой публикацией о жизни Зинаиды Виссарионовны Ермольевой, о её выдающемся вкладе в советскую науку коллектив Ростовского научно-исследовательского института микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора вновь отдает дань памяти великому учёному, страстному исследователю, самоотверженной женщине.

30 апреля 2021 года в Ростов-на-Дону руководитель Роспотребнадзора, Главный государственный санитарный врач России А.Ю. Попова совместно с руководителем аппарата помощника Президента России Е.С. Подобреусовой и губернатором Ростовской области В.Ю. Голубевым обсудили идею установки памятника З.В. Ермольевой в донской столице. В сентябре 2021 г. на территории Ростовского государственного медицинского университета — альма-матер Зинаиды Виссарионовны, состоится торжественное мероприятие по закладке камня в основание будущего памятника советскому учёному. Это дань памяти нашей соотечественнице, учёному и врачу, совершившему важнейшие медицинские открытия во имя здоровья и жизни людей.

Зинаида Виссарионовна Ермольева — выдающийся советский учёный-микробиолог и эпидемиолог, стала инициатором многочисленных передовых исследований, благодаря которым появилась и развилась современная отечественная микробиология и заложены основы биотехнологии. В молодом возрасте, рискуя жизнью, она совершила открытие, позволившее победить холеру. Большой вклад внесла в ликвидацию вспышек инфекционных болезней на

Дону и в Средней Азии, разработав профилактические и лечебные препараты от холеры. В годы Великой Отечественной войны в Сталинграде совместно с коллегами предотвратила эпидемию кишечных инфекций и получила первую советскую версию антибиотика пенициллина, спасшего множество жизней советских солдат. Ее имя всегда было связано с новыми и порой революционными открытиями.

Зинаида Виссарионовна Ермольева родилась 2 октября 1898 г. в одном из хуторов области Войска Донского (ныне город Фролов Волгоградской области). В 1915 г. окончила с золотой медалью Мариинскую женскую гимназию в Новочеркасске и в 1916 г. поступила на первый курс Женского медицинского института Варшавского университета, эвакуированного в годы Первой мировой войны в г. Ростов-на-Дону.

Уже в юности проявились выдающиеся черты её характера: студентка отличалась целеустремленностью, работоспособностью, жадой знаний и сильной волей. Особенно её увлекла экспериментальная исследовательская работа. Позже, уже став знаменитым учёным, Зинаида Виссарионовна Ермольева вспоминала, как в университете любила тайком пробираться в лабораторию ещё до её открытия, чтобы дополнительно час–два посвятить микробиологическим исследованиям. Научную работу в медицинском институте Зинаида Виссарионовна начала под руководством профессора микробиологии Владимира Александровича Барыкина (1879–1939), специализировавшегося на изучении возбудителей холеры. Это определило дальнейшие научные направления исследований Зинаиды Виссарионовны. Окончив университет в 1921 г., она продолжила научную деятельность в качестве ассистента кафедры микробиологии.

В тот период на Дону вспыхнула эпидемия холеры, и молодого перспективного специалиста Зинаиду Ермольеву пригласили возглавить отдел

ЮБИЛЕИ

по изучению холерных вибрионов в Ростовском бактериологическом институте, сегодня это ФБУН «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора. Изучая пути заражения холерой, З.В. Ермольева сумела выделить из водопроводной воды холероподобные вибрионы. Чтобы понять, способны ли они вызвать холеру, она провела опыт на себе — выпила воду с микроорганизмами и спустя несколько часов тяжело заболела. В протоколе одного из экспериментов она записала: «Опыт, который едва не кончился трагически, доказал, что некоторые холероподобные вибрионы, находясь в кишечнике человека, могут превращаться в истинные холерные вибрионы, вызывающие заболевание». Таким образом, талантливым учёным-микробиологом, будущим академиком Зинаидой Виссарионовной Ермольевой в годы работы в институте была доказана возможность реверсии патогенных свойств изменённых штаммов холерных вибрионов, а светящиеся холероподобные вибрионы впоследствии стали носить её имя. Эти исследования З.В. Ермольевой легли в золотой фонд изучения холеры не только в нашей стране, но и за рубежом. На основании опытов микробиолога были созданы санитарные нормы хлорирования воды, которые используются до сих пор. В благодарность за заслуги и огромный вклад в развитие микробиологии, в память о работе в Ростове-на-Дону (1921–1925 гг.) на здании Ростовского НИИ микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора к 100-летию со дня основания института была установлена мемориальная доска З.В. Ермольевой.

Большим достижением Ростовского бактериологического института, кафедр медицинского института и практических учреждений здравоохранения Дона явилась ликвидация в 1921–1927 гг. крупнейших на юге страны эпидемий холеры и брюшного тифа.

В 1925 г. Зинаиду Виссарионовну пригласили в Москву и назначили руководителем отдела биохимии микробов Биохимического института Наркомздрава СССР, который в 1934 г. вошёл в состав Всесоюзного института экспериментальной медицины. Это была первая профильная советская лаборатория по изучению микробной биохимии, основательницей и вдохновительницей которой стала Зинаида Виссарионовна. В Москву также был переведён научный руководитель Зинаиды Виссарионовны профессор Донского университета В.А. Барькин, которого, в свою очередь, назначили научным руководителем Центрального института эпидемиологии и микробиологии Наркомздрава СССР.

В этот период Зинаида Виссарионовна обратила особое научное внимание на исследование ферментов и токсинов микроорганизмов — малоизученные процессы жизнедеятельности микробов. Обмену ценным опытом способствовали её поездки в другие страны, в том числе во Францию и Германию. В 1928 г. З.В. Ермольева побывала в Микробиологическом институте им. Луи Пастера в Париже. Особенно плодотворной оказалась совместная работа Зинаиды Виссарионовны с немецкими коллегами. Статьи с результатами исследований Зинаиды Виссарионовны стали публиковать зарубежные



научные журналы, специализирующиеся на вопросах микробиологии, эпидемиологии и биохимии.

В 1930-е гг. Зинаида Виссарионовна Ермольева активно занялась исследованиями свойств и технологией выделения лизоцима. На этом научном пути З.В. Ермольева взяла за основу обнаруженное в 1909 г. Павлом Лашенковым вещество лизоцим. Ученый нашёл его в курином яйце и установил: оно может приостанавливать рост и размножение микробов. Позже лизоцим нашли в человеческих железах, слюне и тканях. Много лет биологи пытались выяснить природу защиты организма от бактерий, и открытие лизоцима могло приоткрыть завесу тайны над этой биологической загадкой. Определив химическую природу вещества, исследовательница смогла обнаружить лизоцим в различных сельскохозяйственных культурах — хрене, редьке и т.д. Это открытие объяснило эффективность различных народных средств от многих болезней. Более того, она первой смогла концентрировать его, чтобы успешно применять в медицинской практике в качестве антисептика. Фермент лизоцима начали использовать в пищевой промышленности в качестве консерванта. Технология выделения чистого препарата лизоцима принадлежит именно З.В. Ермольевой — в 1970 г. её лаборатории удалось получить это вещество в кристаллическом виде. После этого лизоцим начали использовать в офтальмологии, хирургии, педиатрии и других областях.

К концу 1930-х гг. Зинаида Виссарионовна Ермольева была главным действующим специалистом по борьбе с холерой в стране. Она принимала участие в полных опасностях командировках. В 1939 г. разразилась эпидемия холеры в Афганистане. Советские власти начали организацию профилактических мер, чтобы это опасное заболевание не попало в среднеазиатские социалистические республики. В Ташкент была отправлена группа специалистов, которую возглавила З.В. Ермольева. Дети и взрослые, жители крупных городов и далёких аулов — все были под угрозой заражения. Населению помог препарат, разработанный З.В. Ермольевой. Работая в Ташкентском институте вакцин и сывороток, Зинаида Виссарионовна получила новый комплексный бактериофаговый препарат (коктейль) для лечения одновременно четырех заболеваний: холеры, сальмонеллёза, дифтерии и брюшного тифа. Государство высоко оценило труд плодотворного действующего специалиста. В 1935 г. З.В. Ермольева стала доктором наук, в 1939 г. — профессором. Награды, полученные микробиологом (Сталинская премия, Орден Ленина и Орден Трудового Красного Знамени) были отражением значимости её научной и практической работы.

В 1942 г., в тяжелейший для нашей страны период Великой Отечественной войны, исследователь была направлена в осаждённый Сталинград,

где среди солдат немецких войск началась эпидемия холеры. Была проведена сложная операция по переброске советских ученых в прифронтовую полосу из-за того, что обходными путями раздать необходимое профилактическое средство местным жителям было невозможно. Единственная надежда сталинградцев заключалась в налаживании производства лекарства в самом городе. Несмотря на все опасности, связанные с уличными боями, бомбардировками и прочими ужасами войны, Зинаида Ермольева вместе со своими коллегами организовала массовую профилактику острых кишечных инфекционных заболеваний среди населения. Когда производство холерного бактериофага было налажено, заветное средство начали принимать по 50 тыс. человек в день. Благодаря оперативной работе микробиологов и врачей-эпидемиологов удалось избежать массовой эпидемии холеры в терзаемом вермахтом городе. Также она провела хлорирование колодцев с водой. За разработку современных и быстрых методов диагностики холеры, а также организацию эффективных противоэпидемических и профилактических мероприятий микробиолог получила Сталинскую премию, которую пожертвовала на строительство названного в её честь истребителя.

В Сталинграде, наблюдая за ранеными бойцами Красной армии, Зинаида Ермольева обратила внимание на то, что большая часть воинов умирала не из-за самих ран, а из-за заражения крови и связанных с этим осложнений. Тогда же её лаборатория приступила к исследованиям, посвященным решению данной проблемы. Ермольева начала заниматься изучением свойств плесени, опираясь на открытие Александра Флеминга. В 1929 г. он выявил принципиально новое для медицины вещество — пенициллин. Этот антибиотик, продуцируемый плесневыми грибами, стал настоящей революцией в фармакологии начала XX в. Но Флеминг так и не смог сделать свое открытие массово доступным, т.к. штамм-продуцент ценного вещества был крайне нестабилен. Во время Второй мировой войны западные ученые смогли наладить производство пенициллина, но продавать технологию СССР не стали. Эта задача была поставлена перед З.В. Ермольевой. Пенициллин мог стать основой универсального лекарства от болезней, вызываемых стрептококками и стафилококками. Микробиолог вместе с коллегами приносила в лабораторию плесень, собранную с деревьев и газонов, и выращивала её в лабораторных условиях. Плесень со стены бомбоубежища, 93-й по счету образец, показала необходимую активность. Так уже в 1942 г. появился первый советский отечественный препарат пенициллина «Крустозин», который впоследствии спас многих раненых от смерти и инвалидности. Важным было то, что для его синтеза использовалось только советское сырьё. Через несколько

ЮБИЛЕИ



месяцев в СССР приехал профессор Оксфордского университета Говард Флори, которому удалось добиться аналогичного успеха в США. Британец привёз в Москву собственные образцы лекарства для сравнения. Анализ двух препаратов показал, что пенициллин Ермольевой действовал гораздо эффективнее. Несмотря на это, в 1945 г. Нобелевский комитет наградил премией по физиологии и медицине именно Говарда Флори. Флори назвал З.В. Ермольеву «Госпожой Пенициллин», впоследствии это прозвище закрепилось за ней в научных кругах. Великой заслугой З.В. Ермольевой является то, что она не только разрабатывала диагностические, профилактические и лечебные препараты, но и организовывала их промышленный выпуск.

В послевоенные годы Зинаида Ермольева стала представлять Советский Союз во Всемирной организации здравоохранения. Она отлично знала языки, а перед отечественной медициной у нее было выдающееся количество заслуг.

В 1945–1947 гг. З.В. Ермольева работала директором Института биологической профилактики инфекций. В 1947 г. на базе института был создан Всесоюзный научно-исследовательский институт пенициллина (позднее — Всесоюзный научно-исследовательский институт антибиотиков), в котором она заведовала отделом экспериментальной терапии. В 1950–1960-е гг. она возобновила свою публицистическую деятельность, прерванную войной. С 1952 г. и до конца жизни З.В. Ермольева возглавляла кафедру микробиологии и лабораторию новых антибиотиков Центрального института усовершенствования врачей (ныне Российская медицинская академия непрерывного последипломного образования), кафедра и сегодня носит имя З.В. Ермольевой. Также она основала журнал «Антибиотики» и была его бессменным редактором. В 1956 г. учёный возглавила Комитет ВОЗ по антибиотикам.

На этом посту Зинаида Ермольева оставалась до конца жизни.

В 1960-е гг. Зинаида Виссарионовна разработала способ получения интерферона — средства для профилактики гриппа и других вирусных инфекций, которое широко применяется и в настоящее время для профилактики COVID-19. Под её руководством были разработаны левомецетин, стрептомицин, бициллин и многие другие препараты.

В этот период З.В. Ермольева стала известной на всю страну, благодаря Вениамину Каверину. Советский писатель использовал биографию Зинаиды Виссарионовны в качестве прототипа истории жизни главной героини своего романа «Открытая книга». Он издавался по частям в литературных журналах в 1948–1956 гг. Каверин знал З.В. Ермольеву лично с 1928 г. Их познакомил брат писателя — Лев Зильбер, исследователь в области вирусологии и онкологии. Учёный на протяжении долгого времени был коллегой, а впоследствии мужем Зинаиды Виссарионовны. Во время сталинских репрессий Зильбер оказался в лагере. На одном из свиданий с Зинаидой Виссарионовной он тайно передал ей рукопись своей научной работы, которую исследователь продолжил прямо в ГУЛАГе. Этот эпизод, как и многие другие, демонстрирует огромную смелость и преданность З.В. Ермольевой своему призванию.

З.В. Ермольева опубликовала около 500 научных работ и 6 монографий. В качестве научного руководителя она подготовила к защите около 180 диссертаций, в том числе 34 докторских. Профессор З.В. Ермольева была признана Заслуженным деятелем науки РСФСР. За огромный вклад в науку ей были вручены два ордена Ленина, орден Трудового Красного Знамени, орден «Знак Почета».

Зинаида Виссарионовна продолжала плодотворно работать в науке до конца своей жизни. Она умерла 2 декабря 1974 года, оставив потомкам грандиозное научное наследие. Похоронена в Москве на Кузьминском кладбище.

В 1994 г. З.В. Ермольевой в городе Фролов Волгоградской области на улице, названной в её честь, была установлена памятная доска с надписью «Улица названа именем лауреата Государственной премии СССР академика Ермольевой Зинаиды Виссарионовны. Под её руководством в 1942 г. был разработан способ получения отечественного пенициллина». В 2019 г. на базе Волгоградского государственного университета создан центр развития детей — Дом научной коллаборации имени З.В. Ермольевой.

Жизнь Зинаиды Виссарионовны Ермольевой — пример беззаветного и самоотверженного служения любимой науке, своему народу и Отчизне.

*Твердохлебова Т.И., Агафонова В.В.
Ростовский-на-Дону НИИ микробиологии и
паразитологии, Ростов-на-Дону, Россия*



ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Под редакцией
академика РАН, д.м.н., профессора **В.Г. Акимкина**
д.б.н., профессора **М.Г. Твороговой**

Москва: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 2020. 480 с.
<https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-0-6>

«Лабораторная диагностика инфекционных болезней» содержит развернутую характеристику различных лабораторных исследований, применяемых для этиологической диагностики заболеваний, возбудителями которых являются вирусы, бактерии, грибы, простейшие.

Отмечены достоинства и недостатки прямых и косвенных методов определения более 50 патогенов, сопоставлены их диагностическая чувствительность и специфичность. Сведения о выборе оптимального биоматериала и времени взятия его образцов для исследования, несомненно, помогут клиницисту выбрать эффективный алгоритм для лабораторной диагностики определённой инфекции и позволят избежать лишних затрат времени персонала и материальных средств для выполнения малоинформативных исследований.

Наряду со сведениями о современных направлениях в лабораторной диагностике инфекций в настоящей книге представлена краткая информация об основных видах лабораторных исследований, используемых на современном этапе. Знания о физиологических свойствах применяемых в клинической практике анализитов и диагностическом значении их изменений крайне необходимы в ходе обнаружения проявлений инфекционных болезней, их осложнений и контроля за лечением. Благодаря полноте и разнообразию изложенного материала, широкому спектру затрагиваемых исследований, книга «Лабораторная диагностика инфекционных болезней» будет интересна и полезна широкому кругу читателей: инфекционистам и врачам других специальностей, в том числе специалистам клиничко-диагностических лабораторий и лабораторий центров гигиены и эпидемиологии, а также студентам и аспирантам – биологам и медикам.

Оформить заказ на книгу «Лабораторная диагностика инфекционных болезней» можно через электронный каталог Агентства «Книга-сервис» «Пресса по подписке»:
https://www.akc.ru/itm/laboratornay_a-diagnostika-infekt_sionny_ih-bolezney
Стоимость одного экземпляра: для физических лиц: 1177 руб., для юридических лиц: 1424,93 руб.



Печатная версия «Журнала микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии» распространяется по подписке:

Агентство «Книга-Сервис»

Подписные индексы:

E71436 — подписка на любое
количество номеров,

E10278 — подписка на год

Каталог «Пресса по подписке»

[https://www.akc.ru/itm/z_hurnal-mikrobiologii-y_](https://www.akc.ru/itm/z_hurnal-mikrobiologii-y_epidemiologii-i-immunobiologiiiodovay_a/)
[epidemiologii-i-immunobiologiiiodovay_a/](https://www.akc.ru/itm/z_hurnal-mikrobiologii-y_epidemiologii-i-immunobiologiiiodovay_a/)

Контакты: +7(495)680-90-88, public@akc.ru

ООО «УП Урал-Пресс»

Подписной индекс:

71420 — подписка на любое
количество номеров

Сайт: www.ural-press.ru

Контакты: +7(343)262-65-43,
info@ural-press.ru