

6

НОЯБРЬ – ДЕКАБРЬ

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

6

NOVEMBER – DECEMBER

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:

- 1.2.10. Вирусология (медицинские и биологические науки),
- 1.5.11. Микробиология (медицинские и биологические науки),
- 3.2.2. Эпидемиология (медицинские и биологические науки),
- 3.2.7. Аллергология и иммунология (медицинские и биологические науки).

6

НОЯБРЬ – ДЕКАБРЬ

**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.microbiol.elpub.ru;);
<https://www.elibrary.ru/>;
<https://www.cyberleninka.ru/>;
<https://www.rucont.ru/>;
<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 правилами
для авторов (www.microbiol.elpub.ru).

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

Подписано в печать 27.12.2021.
Формат 60×90^{1/8}. Тираж 280 экз.
Усл.-печ. л. 15,5.

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, научный руководитель Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН, Оренбург

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

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

Жирнов О.П., д.б.н., проф., чл.-корр. РАН, зав. лабораторией вирусного патогенеза Института вирусологии им. Д.И. Иванковского, 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

Куличенко А.Н., д.м.н., проф., член-корр. РАН, директор Ставропольского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия

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

Иностранные члены редакционной коллегии

Alexander V. Bocharov, MD, PhD (Medicine), Staff scientist, Department of Laboratory Chemistry, Clinical Center, National Institutes of Health, Bethesda, USA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Bimonthly scientific and practical journal

Founded in 1924

Peer-reviewed Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology is 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 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 welcomes Russian and foreign original research articles, reviews, brief reports, mini-reviews, opinions and other special featured articles as well as lectures, methodological materials related to its profile.

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:

- 1.2.10. Virology (medical and biological sciences);
- 1.5.11. Microbiology (medical and biological sciences);
- 3.2.2. Epidemiology (medical and biological sciences);
- 3.2.7. Clinical immunology, Allergology (medical and sciences)

6

NOVEMBER–DECEMBER

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>.

FOUNDERS:

Central Research Institute for Epidemiology; Russian Scientific and Practical Society of Epidemiologists, Microbiologists and Parasitologists

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 December 27, 2021. Print format 60×90^{1/8}. Circulation 280 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 for 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), Scientific Director of the Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch of the Academy of Sciences, Orenburg, Russia

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

Alexander N. Kulichenko, D. Sci. (Medicine), Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Director of the Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia

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

Vladimir V. Kuttyrev, 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

Foreign members of the Editorial Board

Alexander V. Bocharov, MD, PhD (Medicine), Staff scientist, Department of Laboratory Chemistry, Clinical Center, National Institutes of Health, Bethesda, USA

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

Alexander N. Lukashev, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director, Martynovskiy Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector-Borne Diseases, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow

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

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

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

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

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

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

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Царёв В.Н., Макеева И.М., Садчикова Е.Р., Подпорин М.С., Трефилова Ю.А., Арзуканян А.В., Гольдман И.Л.

Методика оценки антибактериальной активности полифункционального белка трансферринового ряда при экспериментальном моделировании кинетики развития *Staphylococcus aureus* 618

Лаповок И.А., Барышев П.Б., Салеева Д.В., Кириченко А.А., Шлыкова (Мурзакова) А.В., Киреев Д.Е.

Применение секвенирования следующего поколения для исследования двойной ВИЧ-инфекции* 627

Федотова О.С., Захарова Ю.А., Остапчук А.В., Бажанова У.А., Захаров А.А.

Фенотипический профиль актуальных полирезистентных сиквенс-типов (ST 1167, ST 944, ST 208) *Acinetobacter baumannii* 639

Игнатъев Г.М., Ленева И.А., Отрашевская Е.В., Козловская Л.И., Карташова Н.П., Федякина И.Т., Шустова Е.Ю., Синюгина А.А., Зверев В.В., Трухин В.П., Ишмухаметов А.А.

Формирование специфического иммунитета у лабораторных животных после одновременной вакцинации против сезонного гриппа и COVID-19* 648

Ильин В.К., Бояринцев В.В., Комиссарова Д.В., Тониян К.А., Усанова Н.А., Морозова Ю.А., Муравьева В.В., Байрамова Г.Р., Припутневич Т.В.

Анализ изменения состояния влажной микрофлоры у женщин репродуктивного возраста в условиях трёхсуточной «сухой» иммерсии без использования средств профилактики 657

Тимченко Н.Ф., Елисейкина М.Г., Чернодод Г.К., Грищенко О.В., Раков А.В., Щелканов М.Ю.

Взаимодействие возбудителей сапронозов с клетками наземного растения воробейника краснокорневого 664

Слукин П.В., Асташкин Е.И., Асланян Е.М., Ершова М.Г., Полетаева Е.Д., Светоч Э.А., Шепелин А.П., Фурсова Н.К.

Характеристика вирулентных штаммов *Escherichia coli*, выделенных от пациентов с урологической инфекцией 671

Соломай Т.В., Семененко Т.А., Тутельян А.В., Боброва М.В.

Эпидемиологические особенности инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр* 685

Tolchkov V., Hodzhev Y., Tsafarova B., Bachyska E., Atanasova Yu., Baykova A., Yordanova S., Trovato A., Cirillo D., Panaiotov S.

Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using next generation sequencing and Mykrobe software 697

Медкова А.Ю., Лиджиева А.А., Сёмин Е.Г., Синяшина Л.Н., Сюдюкова Р.А., Снегирёва Н.А., Чернышова И.Н., Гаврилова М.В., Бушкова К.К., Колобухина Л.В., Кружкова И.С., Меркулова Л.Н., Русанова М.Г., Дьяков И.Н., Каратаев Г.И.

Иммуногенность препарата «Живая вакцина интраназального применения для профилактики коклюша» (ГамЖВК) при однократном применении у здоровых добровольцев 706

ОБЗОРЫ

Павлова А.С., Бочарова Ю.А., Кулешов К.В., Подколзин А.Т., Чеботарь И.В.

Молекулярные детерминанты резистентности *Salmonella enterica* к антибиотикам* 721

Указатель статей, опубликованных в журнале в 2021 году 731

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

CONTENTS

ORIGINAL RESEARCHES

Tsarev V.N., Makeeva I.M., Sadchikova E.R., Podporin M.S., Trefilova Yu.A., Arzukanyan A.V., Goldman I.L. Method for the estimation of antibacterial activity of the polyfunctional protein from transferrin family in the experimental model of the kinetics of <i>Staphylococcus aureus</i> development	618
Lapovok I.A., Baryshev P.B., Saleeva D.V., Kirichenko A.A., Shlykova (Murzakova) A.V., Kireev D.E. Application of next generation sequencing in dual HIV infection studies*	627
Fedotova O.S., Zakharova Yu.A., Ostapchuk A.V., Bazhanova U.A., Zakharov A.A. Phenotypic profile of priority multiresistant <i>Acinetobacter baumannii</i> sequence types (ST 1167, ST 944, ST 208).....	639
Ignatyev G.M., Leneva I.V., Atrasheuskaya A.V., Kozlovskaya L.I., Kartashova N.P., Fediakina I.T., Shustova E.Yu., Sinyugina A.A., Zverev V.V., Trukhin V.P., Ishmukhametov A.A. Development of specific immunity in laboratory animals after co-immunization against seasonal influenza and COVID-19*	648
Ilyin V.K., Boyarintsev V.V., Komissarova D.V., Toniyan K.A., Usanova N.A., Morozova Yu.A., Muravieva V.V., Bayramova G.R., Pripitnevich T.V. Analysis of changes in the state of vaginal microflora in women of reproductive age under conditions of a three-day "dry" immersion without the use of prophylaxis.....	657
Timchenko N.F., Eliseikina M.G., Tchernoded G.K., Grishchenko O.V., Rakov A.V., Shchelkanov M.Yu. Interaction of causative agents of sapronoses with the land plant <i>Lithospermum erythrorhizon</i>	664
Slukin P.V., Astashkin E.I., Aslanyan E.M., Ershova M.G., Poletaeva E.D., Svetoch E.A., Shepelin A.P., Fursova N.K. Characterization of virulent <i>Escherichia coli</i> strains isolated from patients with urological infection.....	671
Solomay T.V., Semenenko T.A., Tutelyan A.V., Bobrova M.V. Epidemiological characteristics of Epstein–Barr virus infection*	685
Tolchkov V., Hodzhev Y., Tsafarova B., Bachiyska E., Atanasova Yu., Baykova A., Yordanova S., Trovato A., Cirillo D., Panaiotov S. Drug susceptibility testing of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> using next generation sequencing and Mykrobe software	697
Medkova A.Yu., Lidzhiyeva A.A., Semin E.G., Sinyashina L.N., Syundyukova R.A., Snegireva N.A., Chernyshova I.N., Gavrilova M.V., Bushkova K.K., Kolobukhina L.V., Kruzhkova I.S., Merkulova L.N., Rusanova M.G., Dyakov I.N., Karatayev G.I. Immunogenicity of the drug "Live intranasal vaccine for the prevention of pertussis" (GamLPV) with a single use in healthy volunteers	706
REVIEWS	
Pavlova A.S., Bocharova Yu.A., Kuleshov K.V., Podkolzin A.T., Chebotar I.V. Molecular determinants of antibiotic resistance in <i>Salmonella enterica</i> antibiotic resistance*	721
Index of articles published in 2020	731

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

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-209>



Методика оценки активности полифункционального белка трансферринового ряда при экспериментальном моделировании кинетики развития *Staphylococcus aureus*

Царев В.Н.¹, Макеева И.М.², Садчикова Е.Р.³, Подпорин М.С.¹, Трефилова Ю.А.¹, Арзуканян А.В.², Гольдман И.Л.³

¹Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова, Москва, Россия;

²Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

³Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

Аннотация

Введение. Лактоферрин (ЛФ) представляет собой катионный мономерный гликопротеин, вырабатываемый ацинарными клетками и железами. ЛФ присутствует в разных местах слизистой оболочки в различной концентрации. В связи с разработкой различных вариантов гигиенических и лекарственных средств для лечения воспалительных заболеваний полости рта на основе ЛФ возникла необходимость объективной оценки его антибактериальных и антибиоплёночных свойств с последующим анализом сохранения активности при различных вариантах выделения данного белка из субстрата и хранения.

Цель исследования — повышение эффективности оценки антибактериальной активности ЛФ и продолжительности её сохранения в различных биологических субстратах, содержащих действующее вещество, и отдельных опытных партиях изготовленного препарата с помощью автоматического культивирования.

Материалы и методы. В рамках эксперимента использовалась техника микробиологической диагностики с использованием системы автоматического культивирования микробных популяций. Заранее подготовленную бактериальную взвесь инокулировали в питательный бульон и добавляли исследуемые образцы ЛФ с последующим культивированием и анализом возможного антибактериального воздействия трансферринового белка. Для определения чувствительности выделенных штаммов применяли собственную модификацию метода серийных разведений, разработанную на кафедре микробиологии, вирусологии, иммунологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова. В работе была использована инфраструктура Уникальной научной установки «Трансгенбанк». Результаты интерпретировали по изменению оптической плотности на длине волны $\lambda = 850$ нм. Изучение динамики роста микроорганизмов проводили в нескольких параллелях. Рост бактерий приводил к изменению параметров оптической плотности, на основании которых были построены кривые роста.

Результаты и обсуждение. По результатам экспериментального исследования кривых роста бактериальных популяций отмечены статистически достоверные различия количества жизнеспособных клеток в разные фазы кривых роста при использовании различных образцов ЛФ. Установлена более высокая активность образцов человеческого рекомбинантного ЛФ. При анализе динамики роста выявлены различия в наступлении максимума размножения и его ингибирования при воздействии различных отягощающих факторов в процессе культивирования. Бактериостатическое действие ЛФ реализуется посредством связывания ионов железа, лишая бактерии этого микроэлемента, вызывает ингибирование их развития. Наряду с этим ЛФ проявляет активность против некоторых факторов вирулентности микроорганизмов, расщепляя их по типу сериновых протеаз, и таким образом препятствует их проникновению в клетки человека.

Заключение. Использованная методика автоматического культивирования микроорганизмов в биореакторе позволяет получить воспроизводимые результаты, доступна для широкого использования и может быть рекомендована для получения объективных, сравнимых между собой, достоверных сведений о противомикробных свойствах различных образцов бактерицидного белка ЛФ, выпускаемых отечественной фарминдустрией. Исследуемый субстрат, содержащий рекомбинантный человеческий ЛФ российского производства, характеризуется высокой антибактериальной активностью, сохраняющейся, как минимум, в течение 3 лет.

Ключевые слова: рекомбинантный человеческий лактоферрин, биореактор, культивирование, кривая роста, фарминдустрия

Источник финансирования. Работа выполнялась при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках проекта «Реализация мероприятий и выполнение работ по дооснащению УНУ «Трансгенбанк», обеспечивающих деятельность, повышения уровня её доступности и роста эффективности её использования» (Соглашение № 075-15-2021-668 от 29.07.2021).

Конфликт интересов. В рамках проведения настоящего исследования были использованы инфраструктура уникальной научной установки «Трансгенбанк», предоставленная ФГБУН «Институт биологии гена» РАН, а также субстраты рекомбинантного лактоферрина человека, предоставленные ООО «Лактоферр».

Для цитирования: Царёв В.Н., Макеева И.М., Садчикова Е.Р., Подпорин М.С., Трефилова Ю.А., Арзуканян А.В., Гольдман И.Л. Методика оценки антибактериальной активности полифункционального белка трансферринового ряда при экспериментальном моделировании кинетики развития *Staphylococcus aureus*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(6):617–626.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-209>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-209>

Method for the estimation of antibacterial activity of the polyfunctional protein from transferrin family in the experimental model of the kinetics of *Staphylococcus aureus* development

Victor N. Tsarev¹✉, Irina M. Makeeva², Elena R. Sadchikova³, Mikhail S. Podporin¹, Yulia A. Trefilova¹, Alina V. Arzukanyan², Igor L. Goldman³

¹A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia;

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia;

³Institute of Gene Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Introduction. Lactoferrin is a cationic monomeric glycoprotein produced by acinar cells and glands, present in different places of the mucous membrane in different concentrations. In connection with the development of various variants of hygienic and medicinal products for the treatment of inflammatory diseases of the oral cavity based on lactoferrin, there was a need for an objective assessment of its antibacterial and antibiofilms properties, followed by an analysis of the preservation of activity in various variants of the isolation of this protein from the substrate and storage.

Aim — to improve the effectiveness of evaluating the antibacterial activity of lactoferrin and the duration of its preservation in various biological substrates containing the active substance and individual experimental batches of the manufactured drug using automatic cultivation.

Materials and methods. As part of the experiment, a microbiological diagnostic technique employing a system for the automatic cultivation of microbial populations was used. A pre-prepared bacterial suspension was inoculated into the nutrient broth and the studied lactoferrin samples were added, followed by cultivation and analysis of the possible antibacterial effects of transferrin protein. To determine the sensitivity of the isolated strains, we used our own modification of the serial dilution method developed at the Department of microbiology, virology, immunology of the A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry. The experiment was based on the programmed automatic cultivation using the RTS-1 bioreactor. The interpretation of the results was carried out by changing the optical density at a wavelength of $\lambda = 850$ nm. The study of the growth dynamics of microorganisms was carried out in several repetitions, which was reflected in the graphs of the development of bacterial populations. The assessment of the growth control of the corresponding bacterial species was reflected in the change in the optical density values, on the basis of which the curve was built.

Results and discussion. According to the results of an experimental study of the growth curves of bacterial populations, statistically significant differences in the number of viable cells in different phases of the growth curves were noted, when using different lactoferrin samples. Higher activity of human recombinant lactoferrin samples was established. An analysis of growth dynamics revealed differences in the onset of the maximum reproduction and its inhibition under the influence of various aggravating factors during cultivation. The bacteriostatic effect of lactoferrin is realized through the binding of iron ions, depriving the bacteria of this microelement, causing inhibition of their development. Along with this, lactoferrin is active against certain virulence factors of microorganisms, splitting them like serine proteases, and thus prevents their penetration into human cells.

Conclusion. The method used for automatic cultivation of microorganisms in the bioreactor used allows one to obtain reproducible results, is available for wide use, and can be recommended for obtaining objective, comparable, reliable information about the antimicrobial properties of various samples of the bactericidal protein lactoferrin produced by the domestic pharmaceutical industry. The studied substrate containing recombinant human lactoferrin of Russian production is characterized by high antibacterial activity that persists for 3 years as minimum.

Keywords: recombinant human lactoferrin, bioreactor, cultivation, growth curve, pharmaceutical industry

Funding source. The work was carried out with the financial support of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation within the framework of the project "Implementation of measures and work on the retrofitting of the UNU "Transgenbank", ensuring the activities, increasing the level of its accessibility and increasing the efficiency of its use" (Agreement No. 075-15-2021-668 of 29.07.2021).

Conflict of interest. Within the framework of this study, we used the information structure of the unique scientific device "Transgenbank", provided by the Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, as well as substrates of recombinant human lactoferrin, provided by LLC "Lactoferrin".

For citation: Tsarev V.N., Makeeva I.M., Sadchikova E.R., Podporin M.S., Trefilova Yu.A., Arzukanyan A.V., Goldman I.L. Method for the estimation of antibacterial activity of the polyfunctional protein from transferrin family in the experimental model of the kinetics of *Staphylococcus aureus* development. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(6):617–626.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-209>

Введение

Факторы врождённого иммунитета — универсальный механизм защиты макроорганизма, который способен действовать независимо от природы возбудителя. Многочисленные антимикробные пептиды (АМП), которые выступают как компоненты врождённой иммунной системы, были выделены из живых организмов и имеют различные механизмы действия, которые реализуются в организме, в том числе на уровне полости рта [1]. Среди белков иммунной системы организма, способных связывать железо (семейство трансферринов), следует выделить лактоферрин (ЛФ), который представляет собой катионный мономерный гликопротеин. Этот белок, вырабатываемый ацинарными клетками и железами, присутствует в разных местах слизистой оболочки в различной концентрации [2, 3]. Например, молозиво содержит 100 мкм ЛФ, слезы — 25 мкм, тогда как слюна, спинномозговая жидкость и сыворотка — менее 0,11 мкм. Кроме того, ЛФ высвобождается вторичными гранулами нейтрофилов, присутствующими в очагах воспаления. Его функция на этих участках заключается в секвестрации железа — важнейшего элемента для роста и распространения патогенных микроорганизмов [4].

Благодаря своей структуре и способности конкурентно связывать железо, ЛФ оказывает два важных воздействия на бактерии: бактериостатическое и бактерицидное. Выделяя железо из окружающей среды, т.е. действуя как хелатор, он проявляет выраженный бактериостатический противомикробный эффект [5]. Бактерицидный эффект главным образом связан с его катионным зарядом, который также сохраняется в пептидах, являющихся производными ЛФ (лактоферрицины). Катионный заряд позволяет ЛФ взаимодействовать с отрицательно заряженной клеточной мембраной, в частности, с липополисахаридами в грамотрицательных бактериях или липотейхоевыми кислотами в грамположительных бактериях, что приводит к дестабилизации мембраны и потере селективной проницаемости, вызывая бактериальный лизис [6].

Как известно, микробная биоплёнка зубов и слизистой оболочки рта представляет собой сложный многовидовой консорциум, который взаимо-

действует с факторами местного иммунитета и играет важную роль при развитии патологии пародонта и системных осложнений [7–9]. Учитывая, что микробные биоплёнки обладают высокой устойчивостью к чистке зубов, профессиональным гигиеническим процедурам, применению антисептиков и антибиотиков, безусловно, необходимы новые стратегии как оценки процессов адгезии и колонизации микробиоты на поверхности слизистой оболочки полости рта, коронок и протезов с учётом видового разнообразия [9–12], так и поиска новых терапевтических средств, в качестве которых могут рассматриваться АМП, в частности ЛФ [4, 6].

Немаловажной является способность ЛФ ингибировать развитие антибиотикоустойчивых форм патогенной микрофлоры. Отличительным преимуществом является тот факт, что, в отличие от химиотерапевтических препаратов, к ЛФ не отмечено формирования резистентности у культуры. Более того, при совместном использовании с антибактериальными препаратами данный белок в несколько раз усиливает и пролонгирует эффект их действия [4]. Установлено, что ЛФ способен к дозозависимому пролонгированию фаз роста бактериальных популяций и разрушению микробных биоплёнок или создаёт условия, препятствующие их формированию. В настоящее время охарактеризовано более 2000 АМП, происходящих из природных источников, что подчёркивает важность расширения исследований в данном направлении [6].

В связи с предшествующей разработкой различных вариантов гигиенических и лекарственных средств на основе ЛФ появилась необходимость объективной оценки его антибактериальных свойств с последующим анализом сохранения активности при различных вариантах выделения данного белка из субстрата и хранения.

Цель исследования — повышение эффективности оценки антибактериальной активности ЛФ и продолжительности её сохранения в различных биологических субстратах, содержащих действующее вещество, и отдельных опытных партиях изготовленного препарата с помощью автоматического культивирования.

Материалы и методы

Экспериментальная методика оценки антибактериальной активности исследуемых образцов заключалась в применении автоматической компьютерной системы одновременного культивирования микробных популяций с разными исследуемыми субстратами «RTS-1» («BioSan»). В ней реализована инновационная технология культивирования микроорганизмов за счёт реверсивного вращения пробирки, в основе которой лежит новый способ вихревого перемешивания питательной среды с последующей регистрацией данных процесса клеточного развития в разных пробах в виде кривых роста, проходящих классические фазы: лаг-фазу, фазы экспоненциального (геометрического) роста, стационарную и отмирания [6].

Для процесса культивирования микроорганизмов в биореакторе использовали тип пробирок TubeSpin[®], SW объёмом 50 мл с мембранным фильтром для регулирования газообмена, а также жидкую питательную среду («Himedia Laboratories Pvt. Limited»).

Экспериментальное исследование было выполнено на модели культивирования референтного штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 25993. Перед проведением эксперимента использовали среду обогащения с целью подрачивания культур для приготовления бактериальной взвеси в общем количестве 10 мл. Оптическую плотность (ОП) полу-

ченной взвеси измеряли с помощью денситометра «DEN-1B» («BioSan») по стандарту МакФарланда (в McF). Использовали субстраты, предоставленные российским производителем рекомбинантного ЛФ человека (РЛЧ) компании ООО «Лактоферр». В исследовании и производстве образцов использована уникальная научная установка «Трансгенбанк» на базе ФГБУН «Институт биологии гена» РАН.

Исследуемые образцы содержали РЛЧ, лиофильно высушенные в форме хлопьев:

- образец 1 — суммарный наработанный РЛЧ, 3 года хранения (-32°C);
- образец 2 — РЛЧ, выделенный из замороженного молока ($-18-20^{\circ}\text{C}$);
- образец 3 — РЛЧ, выделенный из свежего молока;
- образец 4 — РЛЧ, выделенный из свежего молока, с мальтодекстрином;
- образец 5 — наработанный РЛЧ, 1 год хранения (-32°C).

Для проведения экспериментов исследуемые образцы разводили в 10 мл питательной среды, которая в дальнейшем использовалась для культивирования микроорганизмов. Относительная концентрация ЛФ в изготовленных партиях составляла 100 мг/мл. В питательный бульон добавляли бактериальную взвесь в концентрации $1,5 \times 10^8$ КОЕ и получали рабочую концентрацию $1,5 \times 10^7$ КОЕ/мл.

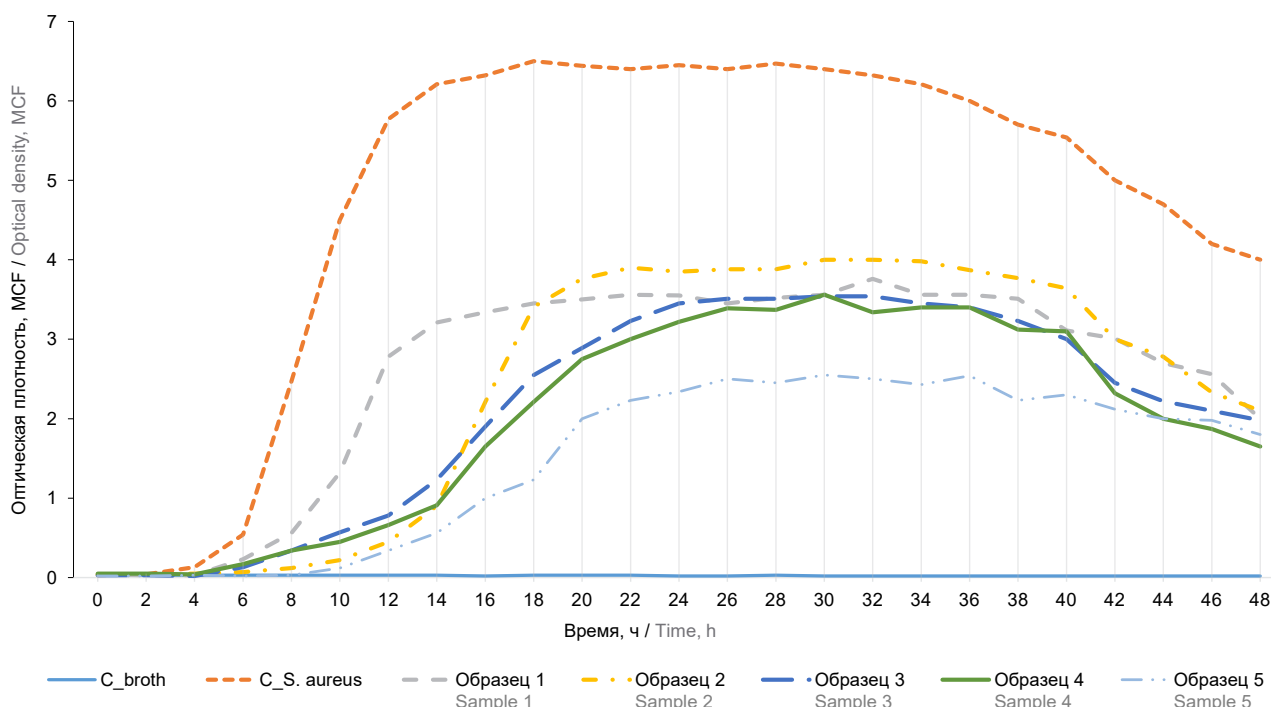


Рис. 1. Автоматическое культивирование *S. aureus* ATCC 25993.

Общий вид фаз развития бактериальной популяции в течение 48 ч.

Fig. 1. Automatic cultivation of *S. aureus* ATCC 25993.

General view of the phases of development of the bacterial population within 48 hours.

Настройки и программа культивирования микробных популяций были индивидуальными для каждого образца. Время культивирования — 48 ч, процесс культивирования — полупериодический.

Статистическую обработку результатов проводили с вычислением средних величин и достоверности различий p по критерию Манна–Уитни с применением компьютерной программы «Biostat 9,0». За достоверную разницу принимали значения $p < 0,05$.

Результаты

Исследование динамики роста микроорганизмов проводили в 6 параллелях, что отражалось на графиках кривых роста бактериальных популяций каждого вида в присутствии различных образцов. Оценка контроля роста тесто-штамма бактерий отражалась в изменении параметров ОП, на основании которых была построена кривая роста микробной популяции.

На кривой роста выделяют несколько участков (фаз развития), каждый из которых характеризуется индивидуальными условиями существования культуры. В различных фазах имеется периодовое дробление, в каждой из них клеткам присущи свои скорость размножения, размеры, биохимическая активность. Все основные фазы роста микроорганизмов были индивидуальны для каждого вида образцов.

По результатам культивирования референтного штамма *S. aureus* ATCC 25993 в контрольных пробах (рис. 1) выявлено, что адаптивная фаза

продолжалась до 4-го часа эксперимента. На промежутке 3–4 ч отмечалось небольшое начальное изменение ОП, связанное с периодом первичного роста популяции. Интервал с 4-го по 14-й час (продолжительность 10 ч) — фаза экспоненциального развития, на протяжении которого отмечались следующие периоды развития: период ускоренной генерации (4–6 ч); период логарифмического развития (6–12 ч); период отрицательного ускорения (12–14 ч). В логарифмическом периоде развития преобладала относительно высокая скорость генерации новых популяций, и максимальный показатель ОП в окончании данного отрезка составил $5,77 \pm 0,3$ МсФ. В результате снижения скорости деления клеток (период отрицательного ускорения) кривая изменения ОП приближалась к линейному вектору развития, и к 16-му часу культивирования была достигнута М-концентрация (показатель ОП — $6,32 \pm 0,3$ МсФ). Стационарная фаза отмечалась продолжительностью на промежутке 16–32 ч. Прироста бактериальных клеток и, следовательно, изменения ОП не отмечалось. Средний показатель ОП — $6,41 \pm 0,3$ МсФ. С 32-го часа эксперимента отмечается фаза гибели микробной популяции, по тенденции логарифмического спада.

В отрицательном контроле стерильности (C_broth) роста тест-штамма *S. aureus* ATCC 25993 не наблюдалось.

Для разных исследуемых образцов получены определённые особенности, которые отражены на графиках кривых роста (рис. 1 и 2), а также скорости прироста бактериальных популяций (рис. 3).

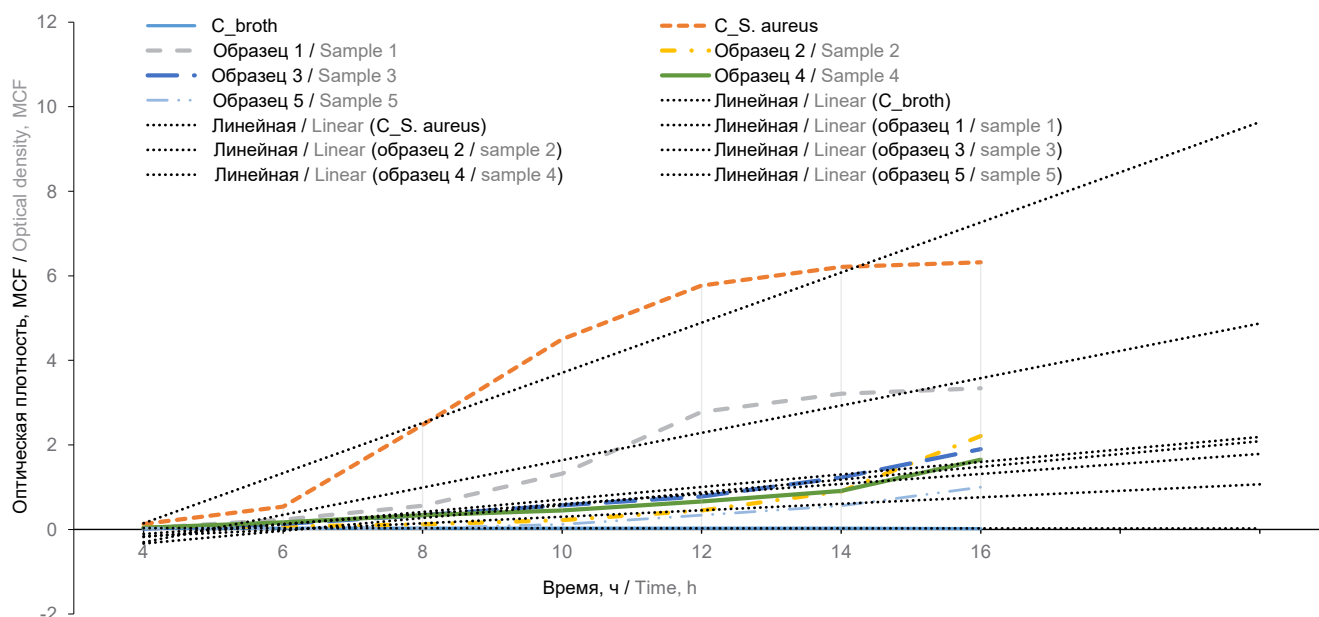


Рис. 2. Автоматическое культивирование *S. aureus* ATCC 25993.

Лог-фаза и переход в экспоненциальное развитие.

Fig. 2. Automatic cultivation of *S. aureus* ATCC 25993.

Lag phase and transition to exponential development.

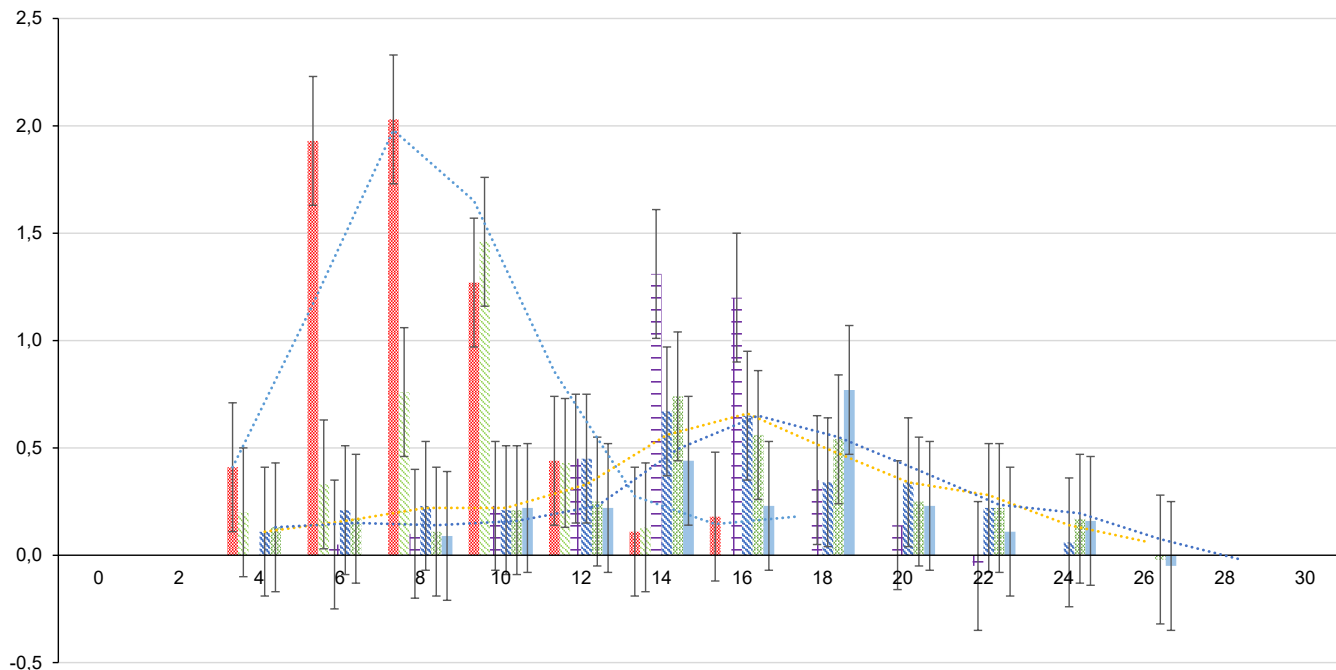


Рис. 3. Скорость бактериального прироста *S. aureus* ATCC 25993.

Fig. 3. The rate of bacterial growth of *S. aureus* ATCC 25993.

Основные статистически достоверные различия для разных образцов представлены в **таблице**.

При культивировании бактериальной популяции с добавлением **образца 1** изменений продолжительности адаптивной фазы не отмечалось. Экспоненциальное развитие было аналогично по протяженности (4–14 ч), однако, по сравнению с контрольным образцом, отмечалась пролонгация периода ускоренного развития до 8 ч. Характер развития логарифмической кривой был близок к контрольному образцу, но пиковый показатель в апогее данного периода был значительно ниже — $2,78 \pm 0,3$ McF (12 ч). Период отрицательного ускорения отмечался постепенным снижением скорости генерации, что привело к достижению M-концентрации (показатель ОП — $3,51 \pm 0,3$ McF, 15 ч). Стационарная фаза отмечалась небольшим удлинением до 34-го часа культивирования без достоверного прироста биомассы. Средний показатель ОП в стационарном равновесии — $3,52 \pm 0,3$ McF, что на 45% ниже, чем в контрольном образце. Фаза отмирания проходила аналогично контрольному образцу.

При культивировании бактериальной популяции с добавлением **образца 2** отмечалась достоверная пролонгация фазы адаптации с первыми признаками бактериального роста только к 8-му часу культивирования. Фаза экспоненциального развития характеризуется отличительным от предыдущих образцов длительным ускоренным развитием (8–14 ч), что повлияло на последующее смещение времени начала истинного логарифмического роста (рис. 3). Логарифмический скачок был сопо-

ставим по тенденции с предыдущими образцами, хотя пиковый показатель ОП (при достижении M-концентрации) немного превосходил предыдущие значения — $3,9 \pm 0,3$ McF (22 ч). Нахождение культуры в стационарном равновесии было укорочено по сравнению с предыдущим образцом на 5 ч. Средний показатель ОП в стационарной фазе — $3,94 \pm 0,3$ McF, что на 38% ниже, чем в контрольной пробирке.

По результатам культивирования бактериальной популяции с добавлением **образца 3** не отмечено задержки продолжительности адаптивной фазы, но период ускоренного развития клеток был увеличен относительно всех предыдущих образцов (продолжительность 8 ч).

Логарифмический период отличался существенно сниженной скоростью бактериальной генерации ($\approx 0,38 \pm 0,3^{h+2}$ McF), что повлияло на более плавное увеличение биомассы, а следовательно, и показатель ОП исследуемого образца. Просматривающейся границы перехода лог-периода в период отрицательного ускорения не наблюдалось. Экспоненциальная фаза данного образца отличалась максимальной продолжительностью относительно предыдущих образцов с пиковым показателем ОП максимальной биомассы к 24-му часу эксперимента ($3,48 \pm 0,3$ McF). Стационарная фаза отмечалась непродолжительностью, без признаков прироста биомассы. Средний показатель ОП в стационарном равновесии — $3,51 \pm 0,3$ McF. Фаза отмирания проходила аналогично контрольному образцу.

Сводные показатели образцов 1–5 по пиковым точкам развития
 Summary indicators of samples 1–5 at the peak points of development

Фаза Phase	Период Period	Образец 1 Sample 1		Образец 2 Sample 2		Образец 3 Sample 3		Образец 4 Sample 4		Образец 5 Sample 5	
		ч / h	McF	ч / h	McF	ч / h	McF	ч / h	McF	ч / h	McF
Адаптивная / Adaptive		0*	0,04	0*	0,04	0*	0,03	0*	0,05	0*	0,02
Экспоненциальная / Exponential	Начало Beginning	4*	0,03	8*	0,12	4*	0,02	4*	0,04	8*	0,03
Экспоненциальная / Exponential	P_1	8**	0,56	14**	0,9	12**	0,78	14**	0,66	14**	0,56
Экспоненциальная / Exponential	P_2	12**	2,78	18**	3,41	18**	2,55	20**	2,21	20**	2,00
Экспоненциальная / Exponential	P_3	15**	3,51	22**	3,9	24**	3,48	26**	3,39	26**	2,54
Стационарная / Stationary		15*	3,51	22*	3,9	24*	3,48	26*	3,39	26*	2,54
Средняя концентрация микробной взвеси по ОП стационарной фазы Average concentration of microbial suspension by optical density at the stationary phase		3,52 ± 0,3*		3,94 ± 0,3		3,51 ± 0,3*		3,41 ± 0,3#		2,49 ± 0,3#	

Примечание. * — время начала фазы/периода кривой роста, ч; ** — время окончания фазы/периода кривой роста, ч; * — достоверное снижение кривой роста в стационарной фазе по сравнению с образцом 2; # — максимальное достоверное снижение кривой роста в стационарной фазе ($p < 0,05$).

Note. * — time of the beginning of the phase/period of the growth curve, h; ** — time of the end of the phase/period of the growth curve, h; * — significant decrease in the growth curve in the stationary phase in comparison with sample 2; # — the maximum significant decrease in the growth curve at the stationary phase ($p < 0.05$).

По результатам культивирования бактериальной популяции с добавлением **образца 4** установлено, что адаптивная фаза аналогична контрольному образцу. В экспоненциальной фазе период ускоренного развития популяции был пролонгирован до 14-го часа эксперимента (на 2 ч дольше, чем в предыдущем образце). Дальнейшее развитие клеток не отличалось от тенденции кривой образца 3. Прослеживались более чёткое снижение скорости генерации новых популяций (с 20-го часа) и более длительный период отрицательного ускорения. Показатель ОП при достижении биомассой М-концентрации — $3,39 \pm 0,3$ McF (26 ч). Стационарная фаза имела небольшое недостоверное изменение ОП, без прироста биомассы, со средним показателем ОП $3,41 \pm 0,3$ McF, что статистически не отличалось от предыдущего образца.

При культивировании бактериальной популяции с добавлением **образца 5** отмечалась задержка наступления экспоненциальной фазы развития за счёт удлинения адаптивной фазы до 8 ч. На промежутке 8–14 ч отмечался период ускоренного развития клеток. Истинное логарифмическое развитие популяции имело двуступенчатую тенденцию увеличения биомассы (диауксийный тип развития). Лог-период_1 — 14–16 ч, лог-период_2 — 18–20 ч. На промежутке 16–18 ч отмечалось резкое падение скорости генерации новых популяций. Максимальный показатель ОП в завершение второго периода логарифмического развития — $2,02 \pm 0,3$ McF (20 ч). Период отрицательного ускорения с последующим добором биомассы культуры был самым продолжительным из всех образцов (7 ч). Переход в стационарное равновесие отмечен на промежутке 25–27 ч

с показателем ОП при достижении М-концентрации $2,54 \pm 0,3$ McF. Средний показатель ОП в стационарной фазе — $2,49 \pm 0,3$ McF, что на 61% ниже, чем в контрольном образце.

Все образцы проявляли антибактериальную активность по отношению к тест-штамму *S. aureus* ATCC 25993, однако при анализе активности ЛФ, содержащегося в разных субстратах (свежее молоко, замороженное молоко, молоко с добавкой мальтодекстрина), и сохранения активности в зависимости от срока хранения (3 года, 1 год) выявлен ряд важных различий с точки зрения перспектив производства препарата (таблица).

Установлено, что первые существенные различия наблюдались уже в первом периоде экспоненциальной фазы (P_1), когда плотность микробной взвеси (0,12 McF) в образце 2 (замороженное молоко) была в 6 раз выше, чем в той же партии свежего молока в образце 3 (0,02 McF). Аналогичные показатели, свидетельствующие о высокой антибактериальной активности, отмечены для образцов 1, 4 и 5, в которых плотность микробной взвеси составляла 0,03–0,04. Указанная тенденция отмечена нами и в последующие периоды роста бактериальных популяций.

Самые выраженные отличия наблюдались в стационарной фазе роста. Средний показатель, отражающий концентрацию микробных клеток, в образце с замороженным молоком ($3,94 \pm 0,3$ McF) был самым высоким и статистически достоверно ($p < 0,05$) отличался от показателя со свежим молоком той же партии ($3,51 \pm 0,3$ McF). Следовательно, можно констатировать, что при замораживании молока активность ЛФ не исчезает, но достоверно снижается.

В то же время установлено, что использование мальтодекстрина (образец 4) в качестве стабилизатора молока достоверно ($p < 0,05$) снижает плотность микробной взвеси (до $3,41 \pm 0,3$ МсФ) по сравнению не только с замороженным молоком, но и со свежим продуктом той же партии. Очевидно, это объясняется сохранением активности ЛФ в присутствии данного стабилизатора.

При оценке сроков хранения ЛФ в морозильной камере при 32°C оказалось, что за 1–3 года антибактериальная активность препарата снижается незначительно. Так, если максимальная активность отмечена у образца с продолжительностью хранения 1 год (минимальная ОП микробной культуры $2,49 \pm 0,3$ МсФ), то при хранении в течение 2 лет она была несколько ниже ($3,52 \pm 0,3$ МсФ), однако статистически достоверно не отличалась, например, от ЛФ свежего молока.

Обсуждение

По мере появления устойчивых к множеству лекарств бактерий, особенно «супербактерий», АМП все чаще признаются в качестве многообещающей терапевтической альтернативы обычным антибиотикам. Антибактериальные пептиды имеют много преимуществ по сравнению с антибиотиками: широкий антибактериальный спектр, хорошую стабильность, минимальные побочные эффекты и низкую лекарственную устойчивость [1, 2].

Полученные нами результаты позволяют утверждать, что разработанный отечественный РЛЧ обладает достаточно высокой стабильностью, он успешно показал свою антибактериальную активность в отношении тест-штамма стафилококка через 1 и 2 года хранения препарата в обычных условиях при комнатной температуре. В наших предыдущих исследованиях была показана антибактериальная активность в отношении микроаэрофильных стрептококков, дрожжевых грибов и анаэробных бактерий, однако без учёта сроков хранения [6].

Как продемонстрировали результаты наших исследований, РЛЧ оказывает весьма выраженное бактериостатическое действие, вызывая отставание в начале большинства фаз роста микробной популяции и существенно снижая плотность (концентрацию) жизнеспособной микробной взвеси и скорость прироста популяции. Основным механизмом действия РЛЧ объясняется связыванием с консервативными структурными компонентами бактериальной оболочки (например, с липополисахаридом и липотейхоевой кислотой грамотрицательных и грамположительных бактерий соответственно), а также непосредственно с мембраной бактериальных клеток, что губительно для бактерий. В некоторых исследованиях ЛФ также связывался с внутриклеточными мишенями и ингибировал важные биологические процессы, включая образова-

ние клеточной стенки и синтез ДНК, РНК и белков [13, 14].

В то же время пародонтопатогенные бактерии обладают персистентным потенциалом — способностью длительное время существовать в организме хозяина, в том числе за счёт инактивации ряда факторов врождённого иммунитета, что, в частности, определяет видовой состав микробной биоплёнки пародонта. В свою очередь многие пародонтопатогенные бактерии, в частности, ведущие возбудители — *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* для обеспечения своих метаболических потребностей нуждаются в ионах железа, которые конкурентно связываются гликопротеинами трансферринового ряда, что отрицательно сказывается на популяции патогенов и всей структуре микробной биоплёнки пародонта [9, 11, 12, 15].

Рассматривая ЛФ в качестве фактора эффекторной защиты макроорганизма, следует признать, что этот железосвязывающий гликопротеин из семейства трансферринов распространён в организме достаточно широко. Ключевое биологическое назначение ЛФ — поддержание гомеостаза макроорганизма, что особенно существенно при инфекции, за счёт участия ЛФ в обмене железа, регуляции гемопоеза, прямого и опосредованного антимикробного действия и других функций [3, 16].

Антимикробный спектр ЛФ широк и охватывает бактерии, грибы, простейшие, вирусы. Патогены многообразны и включаются в конкуренцию с микроорганизмами за ионы железа в среде, нарушение транспортной функции цитоплазматической мембраны бактерий, протеолитическое расщепление ряда факторов вирулентности микроорганизмов, образование активных производных (лактоферрицинов), стимуляцию фагоцитоза и роста нормальной микрофлоры.

Заключение

Предложена методика автоматического программируемого культивирования для сравнительной оценки антимикробной активности ЛФ разного происхождения и в зависимости от срока годности. При добавлении образцов ЛФ выявлены различия в развитии бактериальных популяций *S. aureus*. В целом можно констатировать, что почти все образцы обладают бактериостатическим действием разной степени выраженности.

Установлена активность белка в отношении разных фаз роста бактериальной популяции (в течение различных периодов эксперимента). Все образцы показали статистически достоверное различие при достижении М-концентрации, тем самым существенно снижая генеративную активность исследуемого штамма.

Активность образцов экспериментальной партии РЛЧ сохраняется в течение 1 года и очень незна-

чительно снижается через 3 года хранения в морозильной камере при 32°C. Автоматическое культивирование с подтверждающим бактериологическим контролем позволяет оценить возможную антимицробную активность различных видов ЛФ, включая воздействие в отношении антибиотикоустойчивых форм патогенных микроорганизмов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Олсуфьева А.В., Васянина К.А., Зоткин Д.А., Ключева Л.А., Олсуфьев С.С., Чиж Р.С. и др. Роль органов полости рта в реализации местного иммунитета с элементами морфологии язычных желёз. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2021; 172(8): 186–92. <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2021-172-8-186-192>
2. Кузнецов И.А., Потиевская В.И., Качанов И.В. Изучение железосодержащих белков (лактоферрин, ферритин) при физиологических состояниях и в лабораторной диагностике заболеваний. В кн.: Гуляев Г.Ю. *Инновационное развитие: потенциал науки и современного образования*. Пенза: Наука и просвещение; 2017: 156–65.
3. Кузнецов И.А., Потиевская В.И., Качанов И.В., Куралева О.О. Роль лактоферрина в биологических средах человека. *Современные проблемы науки и образования*. 2017; (3): 69.
4. Goldman I.L., Georgieva S.G., Gurskiy Y.G., Krasnov A.N., Deykin A.V., Popov A.N., et al. Production of human lactoferrin in animal milk. *Biochem. Cell. Biol.* 2012; 90(3): 513–9. <https://doi.org/10.1139/o11-088>
5. Akiyama Y., Oshima K., Kuhara T., Shin K., Abe F., Iwatsuki K., et al. A lactoferrin-receptor, intelectin 1, affects uptake, sub-cellular localization and release of immunochemically detectable lactoferrin by intestinal epithelial Caco-2 cells. *J. Biochem.* 2013; 154(5): 437–48. <https://doi.org/10.1093/jb/mvt073>
6. Царев В.Н., Гольдман И.Л., Садчикова Е.Р., Ипполитов Е.В., Подпорин М.С. Оценка влияния рекомбинантного лактоферрина человека на характеристики кривых роста бактериальных популяций патогенов. *Национальные приоритеты России*. 2016; (4): 130–3.
7. Gendreau L., Loewy Z.G. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J. Prosthodont.* 2011; 20(4): 251–60. <https://doi.org/10.1111/j.1532-849x.2011.00698.x>
8. Gleiznys A., Zdanavičienė E., Žilinskas J. *Candida albicans* importance to denture wearers. A literature review. *Stomatologija*. 2015; 17(2): 54–66.
9. Балмасова И.П., Царев В.Н., Янушевич О.О., Маев И.В., Мкртумян А.М., Арутюнов С.Д. *Микроэкология пародонта. Взаимосвязь локальных и системных эффектов*. М.: Практическая медицина; 2021.
10. Шлепотина Н.М., Пешикова М.В., Колесников О.Л., Шишкова Ю.С. Современные представления о механизмах взаимодействия биопленки и факторов клеточного иммунитета. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(1): 83–90. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-1-83-90>
11. Ипполитов Е.В., Диденко Л.В., Царёв В.Н. Особенности морфологии биоплёнки пародонта при воспалительных заболеваниях дёсен (хронический катаральный гингивит, хронический пародонтит, кандидо-ассоциированный пародонтит) по данным электронной микроскопии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(12): 59–64.
12. Царев В.Н., Николаева Е.Н., Ипполитов Е.В. Пародонтопатогенные бактерии — основной фактор возникновения и развития пародонтита. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2017; 94(5): 101–12. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2017-5-101-112>
13. Sharma S., Sinha M., Kaushik S., Kaur P., Singh T.P. C-lobe of lactoferrin: the whole story of the half-molecule. *Biochem. Res. Int.* 2013; 2013: 271641. <https://doi.org/10.1155/2013/271641>
14. Cornish J., Naot D. Lactoferrin as an effector molecule in the skeleton. *Biometals*. 2010; 23(3): 425–30. <https://doi.org/10.1007/s10534-010-9320-6>
15. Агарков Н.М., Ткаченко П.В., Замулин Д.О., Аксёнов В.В., Гонtareва И.С., Кича Д.И. и др. Прогнозирование развития периапикального абсцесса при хроническом периодонтите у детей по параметрам крови и клеточного иммунитета. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(1): 31–4. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-1-31-34>
16. Бухарин О.В., Вальшев А.В., Вальшева И.В. Роль лактоферрина в противоинойфекционной защите. *Успехи современной биологии*. 2011; 131(2): 135–44.

REFERENCES

1. Olsuf'eva A.V., Vasyanina K.A., Zotkin D.A., Klyueva L.A., Olsuf'ev S.S., Chizh R.S., et al. The role of oral organs in the implementation of local immunity with elements of the morphology of the lingual glands. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2021; 172(8): 186–92. <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2021-172-8-186-192> (in Russian)
2. Kuznetsov I.A., Potievskaya V.I., Kachanov I.V. The study of iron-containing proteins (lactoferrin, ferritin) in physiological conditions and in the laboratory diagnosis of diseases. In: Gulyaev G.Yu. *Innovative Development: The Potential of Science and Modern Education [Innovatsionnoe razvitiye: potentsial nauki i sovremennoogo obrazovaniya]*. Penza: Nauka i Prosveshchenie; 2017: 156–65. (in Russian)
3. Kuznetsov I.A., Potievskaya V.I., Kachanov I.V., Kuraleva O.O. The role of lactoferrin in human biological environments. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya*. 2017; (3): 69. (in Russian)
4. Goldman I.L., Georgieva S.G., Gurskiy Y.G., Krasnov A.N., Deykin A.V., Popov A.N., et al. Production of human lactoferrin in animal milk. *Biochem. Cell. Biol.* 2012; 90(3): 513–9. <https://doi.org/10.1139/o11-088>
5. Akiyama Y., Oshima K., Kuhara T., Shin K., Abe F., Iwatsuki K., et al. A lactoferrin-receptor, intelectin 1, affects uptake, sub-cellular localization and release of immunochemically detectable lactoferrin by intestinal epithelial Caco-2 cells. *J. Biochem.* 2013; 154(5): 437–48. <https://doi.org/10.1093/jb/mvt073>
6. Tsarev V.N., Gol'dman I.L., Sadchikova E.R., Ippolitov E.V., Podporin M.S. Assessing the impact of recombinant human lactoferrin on the characteristics of the growth curves of bacterial pathogens populations. *Natsional'nye prioritety Rossii*. 2016; (4): 130–3. (in Russian)
7. Gendreau L., Loewy Z.G. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J. Prosthodont.* 2011; 20(4): 251–60. <https://doi.org/10.1111/j.1532-849x.2011.00698.x>
8. Gleiznys A., Zdanavičienė E., Žilinskas J. *Candida albicans* importance to denture wearers. A literature review. *Stomatologija*. 2015; 17(2): 54–66.
9. Balmasova I.P., Tsarev V.N., Yanushevich O.O., Maev I.V., Mkrtyumyan A.M., Arutyunov S.D. *Microecology of Periodontal Disease. The Relationship of Local and Systemic Effects [Mikroekologiya parodonta. Vzaimosvyaz' lokal'nykh i sistemnykh effektov]*. Moscow: Prakticheskaya meditsina; 2021. (in Russian)
10. Shlepotina N.M., Peshikova M.V., Kolesnikov O.L., Shishkova Yu.S. Modern ideas about the mechanisms of interaction of biofilm and cellular immunity factors. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(1): 83–90. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-1-83-90> (in Russian)

11. Ippolitov E.V., Didenko L.V., Tsarev V.N. Morphology features of periodontal biofilm in inflammatory gum diseases (chronic catarrhal gingivitis, chronic periodontitis, candida-associated periodontitis) according to electron microscopy. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 60(12): 59–64. (in Russian)
12. Tsarev V.N., Nikolaeva E.N., Ippolitov E.V. Periodontopathogenic bacteria of the main factors of emergence and development of periodontitis. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2017; 94(5): 101–12. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2017-5-101-112> (in Russian)
13. Sharma S., Sinha M., Kaushik S., Kaur P., Singh T.P. C-lobe of lactoferrin: the whole story of the half-molecule. *Biochem. Res. Int*. 2013; 2013: 271641. <https://doi.org/10.1155/2013/271641>
14. Cornish J., Naot D. Lactoferrin as an effector molecule in the skeleton. *Biometals*. 2010; 23(3): 425–30. <https://doi.org/10.1007/s10534-010-9320-6>
15. Agarkov N.M., Tkachenko P.V., Zamulin D.O., Aksenov V.V., Gontareva I.S., Kicha D.I. The prognostication of development of peri-apical abscess under chronic periodontitis by blood parameters and cell immunity in children. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2018; 63(1): 31–4. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-1-31-34> (in Russian)
16. Bukharin O.V., Valyshev A.V., Valysheva I.V. The role of lactoferrin in anti-infective defense. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2011; 131(2): 135–44. (in Russian)

Информация об авторах

Царев Виктор Николаевич — д.м.н., профессор, директор Научно-исследовательского медико-стоматологического института при МГМСУ им. А.И. Евдокимова, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия, nikola777@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3311-0367>

Макеева Ирина Михайловна — д.м.н., профессор, директор Института стоматологии, зав. кафедрой терапевтической стоматологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7878-0452>

Садчикова Елена Рубеновна — к.х.н., зам. директора Института биологии гена РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2039-7108>

Подпорин Михаил Сергеевич — к.м.н., н.с. лаб. молекулярно-биологических исследований Научно-исследовательского медико-стоматологического института при МГМСУ им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6785-0016>

Трефилова Юлия Александровна — старший преподаватель кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0443-4071>

Арзуканян Алина Владимировна — аспирант кафедры терапевтической стоматологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5087-6647>

Гольдман Игорь Львович — к.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник Института биологии гена РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1534-3367>

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 01.04.2021;
принята к публикации 26.08.2021;
опубликована 25.12.2021

Information about the authors

Victor N. Tsarev — D. Sci. (Med.), Professor, Director, Scientific Research Institute of Medicine and Dentistry, Head, Department of microbiology, virology, immunology, A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia, nikola777@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3311-0367>

Irina M. Makeeva — D. Sci. (Med.), Professor, Director, Institute of Dentistry, Head, Department of therapeutic dentistry, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7878-0452>

Elena R. Sadchikova — Cand. Sci. (Chem.), Deputy director, Institute of Gene Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2039-7108>

Mikhail S. Podporin — Cand. Sci. (Med.), researcher, Laboratory of molecular biological investigation, Scientific Research Institute of Medicine and Dentistry, A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6785-0016>

Yulia A. Trefilova — senior lecturer, Department of microbiology, virology, immunology, A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0443-4071>

Alina V. Arzukanyan — postgraduate student, Department of therapeutic dentistry, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5087-6647>

Igor L. Goldman — Cand. Sci. (Med.), Professor, leading researcher, Institute of Gene Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1534-3367>

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 01.04.2021;
accepted for publication 26.08.2021;
published 25.12.2021



Применение секвенирования следующего поколения для исследования двойной ВИЧ-инфекции

Лаповок И.А.[✉], Барышев П.Б., Салеева Д.В., Кириченко А.А., Шлыкова (Мурзакова) А.В., Киреев Д.Е.

Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Аннотация

Введение. Целью исследования был сравнительный анализ эффективности выявления и подтверждения двойной ВИЧ-инфекции с применением классического популяционного секвенирования (ПС) и секвенирования следующего поколения (NGS) для фрагмента гена *pol* ВИЧ-1, кодирующего протеазу и часть обратной транскриптазы (позиции 2253–3368).

Материалы и методы. Исследованы модельные образцы межсубтиповой двойной ВИЧ-инфекции, содержащие вирусы ВИЧ-1 субтипа В, субсубтипа А6 и рекомбинантной формы CRF63_02A1. Вирусы смешивали попарно в соотношении от 10 до 90% для создания 3 групп модельных образцов: CRF63vsB, CRF63vsA6 и A6vsB. Нуклеотидные последовательности, полученные технологиями ПС и NGS, с порогом чувствительности к минорным вариантам вируса 5, 10, 15 и 20% (NGS5–NGS20 соответственно) использовали для определения величин индекса вырожденности (DB) и индекса синонимичности (SM). Фрагмент исследуемого региона (позиции 2725–2981) служил для анализа операционных таксономических единиц.

Результаты. Применение NGS5 оказалось наиболее эффективным для выявления двойной ВИЧ-инфекции в модельных образцах. Было обнаружено статистически достоверное ($p < 0,01$) увеличение DB- и SM-индексов для NGS5 по сравнению с ПС. Это позволило с помощью NGS5 выявить двойную ВИЧ-инфекцию в 25 модельных образцах из 27, в то время как ПС позволяло выявлять её лишь в 15 образцах. Анализ операционных таксономических единиц подтвердил двойную ВИЧ-инфекцию во всех группах модельных образцов.

Обсуждение. Эффективность выявления и подтверждения двойной ВИЧ-инфекции зависит как от доли каждого вируса в образце, так и от генетических особенностей данных вирусов.

Заключение. Внедрение в рутинную практику генетического анализа технологии NGS позволит не только более эффективно выявлять генетические особенности инфекционных агентов, но и проводить более глубокий анализ эпидемиологической ситуации.

Ключевые слова: двойная ВИЧ-инфекция, модельный образец, секвенирование следующего поколения, нуклеотидная последовательность, область протеазы и обратной транскриптазы, индекс вырожденности, индекс синонимичности, операционные таксономические единицы

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: Лаповок И.А., Барышев П.Б., Салеева Д.В., Кириченко А.А., Шлыкова (Мурзакова) А.В., Киреев Д.Е. Применение секвенирования следующего поколения для исследования двойной ВИЧ-инфекции. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(6):627–638.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-153>

Application of next generation sequencing in dual HIV infection studies

Ilya A. Lapovok[✉], Pavel B. Baryshev, Daria V. Saleeva, Alina A. Kirichenko, Anastasiia V. Shlykova (Murzakova), Dmitry E. Kireev

Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. The aim of the study was to use comparative analysis for assessing efficiency of detection and confirmation of dual HIV infection, using conventional population sequencing (PS) and next generation sequencing (NGS) for an HIV-1 *pol* gene fragment, which encompasses protease and partially reverse transcriptase (positions 2253–3368).

Materials and methods. The study was performed on intersubtype dual HIV infection model samples containing viruses of HIV-1 subtype B, sub-subtype A6 and recombinant form CRF63_02A1. Viruses were mixed pairwise in proportions from 10 to 90% to obtain 3 groups of model samples: CRF63vsB, CRF63vsA6, and A6vsB. The nucleotide sequences obtained by using PS and NGS technologies having 5, 10, 15, and 20% sensitivity thresholds for minor virus variants (NGS5–NGS20, respectively) were used to estimate the number of degenerate nucleotides or the degenerate base (DB) count and the number of synonymous mutations (SM) or the SM count. The fragment of the studied region (positions 2725–2981) was used for the analysis of operational taxonomic units.

Results. The application of NGS5 proved highly efficient for detection of dual HIV infection in the model samples. The statistically significant ($p < 0.01$) increase in DB and SM counts was demonstrated by NGS5 compared to PS. As a result, NGS5 helped detect dual HIV infection in 25 out of 27 model samples, while with PS it was detected only in 15 samples. The analysis of operational taxonomic units confirmed dual HIV infection in all the groups of model samples.

Discussion. The efficiency of detection and confirmation of dual HIV infection depends both on the content of each virus in the sample and on genetic characteristics of these viruses.

Conclusion. Using NGS genetic testing in routine practice will be instrumental for efficient identification of genetic characteristics of infectious agents and for thorough analysis of the epidemiological situation.

Keywords: dual HIV infection, model sample, next generation sequencing, nucleotide sequence, protease and reverse transcriptase region, degenerate base count, synonymous mutation count, operational taxonomic units

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: Lapovok I.A., Baryshev P.B., Saleeva D.V., Kirichenko A.A., Shlykova (Murzakova) A.V., Kireev D.E. Application of next generation sequencing in dual HIV infection studies. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(6):627–638. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-153>

Введение

Двойная ВИЧ-инфекция, т.е. доказанный факт наличия в организме одного пациента 2 и более вариантов ВИЧ (ВИЧ-1 и/или ВИЧ-2) [1], встречается в мире с различной частотой в разных странах и среди разных уязвимых групп. При этом отмечается прямая зависимость между частотой встречаемости этого явления, уровнем бедности в государстве и степенью маргинализации уязвимых групп. Так, в Нидерландах частота двойной ВИЧ-инфекции в группе мужчин, практикующих секс с мужчинами (МСМ), составляет 1% [2], в Бразилии (также среди МСМ) — более 12% [3], а в Уганде среди коммерческих секс-работниц — более 16% [4]. В группе МСМ в Китае [5] этот показатель сильно различается — по разным источникам, от 13,3 до 28%, что, вероятно, связано с сильной стигматизацией этой уязвимой группы в стране. В России частота двойной ВИЧ-инфекции не превышает 1,5% [6], что характерно для развитых стран Западной Европы.

Поскольку двойная ВИЧ-инфекция связана с генерацией новых рекомбинантных форм вируса, прогрессией инфекции и даже селекцией лекарственной устойчивости [1], её выявление и подтверждение являются очень важной задачей.

Факт двойной ВИЧ-инфекции наиболее достоверно подтверждается с помощью метода секвенирования единичных геномов (SGS, single genome sequencing), который служит «золотым стандартом» в диагностике этого явления [7, 8]. Суть методики

заключается в секвенировании геномов отдельных вирусных частиц после предельного разведения образца [7], амплификации отдельных фрагментов вирусного генома и их последующего клонирования для наработки клонов, содержащих фрагменты от каждого вирусного варианта, присутствующего в образце [2]. Затем каждый клон подвергается секвенированию, а полученные нуклеотидные последовательности (НП) — филогенетическому анализу. Двойная ВИЧ-инфекция подтверждается в случае достоверного (более чем 80% независимых построений) образования отдельных кластеров на дендрограмме, характерных для отдельных вирусных вариантов [2].

Объектом исследования чаще всего выступают короткие области генома: область V2–V3 петель гена *env*, фрагмент гена *gag*, кодирующий p17 и/или p24 [9], фрагмент гена обратной транскриптазы (RT) ВИЧ-1 [8–10]. Кроме того, возможно применение одновременного анализа сразу нескольких упомянутых выше фрагментов генома [8].

Сложность использования SGS для рутинного анализа связана с его трудоёмкостью и финансовыми затратами. Так, исследование 2010 г. [8] показало, что анализ одного образца по 2 областям генома методом SGS занимает примерно 42 ч и обходится более чем в 2600 долл. США. В сравнении с этим анализ гена *pol* (область протеазы и обратной транскриптазы, PR-RT), проводимый методом классического секвенирования в рамках рутинного те-

стирования на лекарственную устойчивость ВИЧ-1, занимает всего 3 ч пробоподготовки и стоит менее 280 долл. США.

На помощь исследователям двойной ВИЧ-инфекции приходит технология секвенирования следующего поколения (next generation sequencing — NGS), позволяющая выявлять минорные варианты вируса с представленностью в пробе менее 1% [11]. Такая чувствительность позволяет использовать технологию NGS как альтернативу SGS. Этот подход является не только более технологичным, но и более выгодным. Так, NGS для одновременного анализа сразу 3 областей генома занимает около 9,5 ч и стоит чуть более 1000 долл. США, что более чем в 4 раза быстрее и более чем 2,5 раза дешевле, чем SGS [8].

Полученные в ходе NGS данные о НП в образце, именуемые также «ридами», подвергаются последующему математическому анализу для формирования операционных таксономических единиц (operational taxonomic units, OTUs) — НП, образованных ридями с определённой степенью схожести [9]. Дальнейший филогенетический анализ OTUs проводится аналогично анализу единичных геномов, получаемых в результате SGS.

Несмотря на относительную технологическую доступность анализа по подтверждению двойной ВИЧ-инфекции, открытым остаётся вопрос первичного выявления таких образцов. Действительно, на факт двойной ВИЧ-инфекции наиболее часто указывают изменения клинической картины: резкое увеличение концентрации РНК ВИЧ (вирусной нагрузки) в крови пациента, падение числа CD4-клеток на фоне длительной непрогрессии или медленной прогрессии ВИЧ-инфекции [7, 12, 13]. Однако данные проявления справедливы лишь для суперинфекции ВИЧ, когда заражение новым вирусным вариантом происходит уже после формирования иммунного ответа на заражение первым вирусом [14]. В случае же коинфекции ВИЧ (инфицирования 2 и более вирусными вариантами одновременно или спустя короткий промежуток времени) [15] или при недостаточном регулярном обследовании пациента факт двойной ВИЧ-инфекции может не регистрироваться.

Впрочем, детектировать факт двойной ВИЧ-инфекции возможно при дополнительном исследовании результатов тестирования лекарственной устойчивости ВИЧ-1. Анализ лекарственной устойчивости, в основе которого лежит классическое секвенирование по Сэнгеру (называемое также популяционным секвенированием — ПС) [7, 14], позволяет получать НП различных областей генома ВИЧ-1, в том числе наиболее часто исследуемой области PR-RT, кодирующей протеазу и обратную транскриптазу вируса. Было обнаружено, что наличие большого количества спорных или вырожденных нуклеотидных позиций (для которых получен сигнал об одновременном наличии в этом

положении генома сразу нескольких нуклеотидов) в участке RT (позиции 2550–3554) указывает на одновременное присутствие в образце разных вариантов ВИЧ-1 [2]. Чем больше число вырожденных нуклеотидов (индекс вырожденности — ДВ-индекс) в последовательности, тем выше вероятность двойной ВИЧ-инфекции в образце.

Другим подходом является подсчёт отношения числа синонимичных замен к числу всех возможных сайтов синонимичных замен области PR-RT, позиции 2253–3554 (индекс синонимичности — SM-индекс) [8]. При этом несинонимичные мутации (приводящие к изменению аминокислотной последовательности) целенаправленно не учитываются. Этот метод основан на том, что в природе несинонимичные мутации зачастую являются следствием изменения вируса под влиянием факторов организма или применяемой терапии, в то время как синонимичные мутации выражают естественное разнообразие вирусной популяции при двойной ВИЧ-инфекции. Поэтому в случае двойной ВИЧ-инфекции обнаруженные мутации будут в основном синонимичными.

Вполне естественно, что эффективность анализа вырожденности и синонимичности наиболее высока для двойной ВИЧ-инфекции, вызванной разными субтипами ВИЧ (межсубтиповая), разными группами, например М и О (межгрупповая), или типами вируса (межтиповая, связанная с одновременной инфекцией ВИЧ-1 и ВИЧ-2), по сравнению с внутрисубтиповой, вызванной разными генетическими вариантами одного субтипа [1].

Сложность применения ПС для выявления двойной ВИЧ-инфекции связана с чувствительностью этой технологии: данное секвенирование способно выявлять варианты вируса с представленностью в вирусной популяции от 20% и выше [16]. Решением этой проблемы может служить вышеописанная технология NGS, которая уже доказала свою успешность при выявлении мутаций лекарственной устойчивости в регионе PR-RT по сравнению с ПС [17]. При этом важно корректно устанавливать порог чувствительности NGS к минорным вирусным вариантам. Так, в рутинной практике анализа лекарственной устойчивости наиболее надёжным и информативным является порог чувствительности 5% [17, 18].

Поскольку ранее успешно был апробирован подход по анализу OTUs для небольшого фрагмента RT (положения 2708–3242) [8], применение технологии NGS для секвенирования региона PR-RT может позволить как детектировать двойную ВИЧ-инфекцию (через подсчёт ДВ- и SM-индексов), так и подтверждать её.

Целью настоящего исследования был сравнительный анализ эффективности выявления двойной ВИЧ-инфекции с применением ПС и NGS с различными порогами чувствительности к ми-

норным вирусным вариантам для региона PR-RT, а также оценка эффективности применения полученных результатов NGS для подтверждения двойной ВИЧ-инфекции методом анализа OTUs.

Материалы и методы

Была смоделирована межсубтипная двойная ВИЧ-инфекция путём попарного смешивания образцов плазмы крови, содержащей ВИЧ-1 3 вариантов: субтипа В, субсубтипа А6 и рекомбинантной формы CRF63_02A1. Концентрацию РНК ВИЧ-1 каждого образца для правильного смешивания определяли с помощью тест-системы «АмплиСенс ВИЧ-монитор-FRT» (ЦНИИ Эпидемиологии). Всего было подготовлено 9 вариантов попарных смесей вирусов с представленностью каждого вируса в смеси от 10 до 90%. Кроме этого, исследованию подвергались контрольные образцы, содержащие только ВИЧ-1 субтипа В, субсубтипа А6 и CRF63_02A1. Уровень вирусной нагрузки в каждом модельном образце составлял 5000 копий/мл.

Классическое ПС проводили с помощью набора «АмплиСенс HIV-Resist-Seq» (ЦНИИ Эпидемиологии) в соответствии с инструкцией производителя. Секвенирование очищенных фрагментов осуществляли с помощью генетического анализатора «Applied Biosystems 3500» («LifeTechnologies») в соответствии с инструкциями производителя. Данные секвенирования обрабатывали с помощью программного обеспечения «ДЕОНА» (версия 1.7.0). Как итог, были получены НП фрагмента PR-RT ВИЧ-1 (нуклеотидные позиции 2253–3368 относительно НХВ-2, номер GenBank K03455).

При подготовке проб к NGS использовали двухэтапный протокол «вложенной» (nested) ПЦР для получения 4 перекрывающихся специфических фрагментов ДНК ВИЧ-1 длиной 427–586 нуклеотидов. На первом этапе (раунде) амплификацию сочетали с обратной транскрипцией с применением полимеразы TaqF и обратной транскриптазы MMLv (ЦНИИ Эпидемиологии). Амплифицированные фрагменты генома ВИЧ-1 очищали с помощью магнитных частиц Sera-Mag Magnetic Speed Beads («GE Healthcare Biosciences»). Концентрации нуклеиновых кислот во фрагментах измеряли с помощью флуориметра «Qubit 2.0» («Invitrogen»). Очищенные препараты амплифицированных фрагментов ВИЧ-1 смешивали в равных пропорциях, и 50 нг конечной смеси использовали для получения библиотек для секвенирования на платформе «Illumina». Библиотеки готовили по протоколу Nextera («Illumina») со следующей модификацией: амплификацию проводили с использованием ДНК-полимеразы Q5 High-Fidelity («NEB») в присутствии интеркалирующего красителя EvaGreen («Biotium»). Секвенирование выполняли с помощью «MiSeq» («Illumina»), используя MiSeq Reagent Kit V3 («Illumina»).

Результаты секвенирования и сборки генома (положения 2253–3368) обрабатывали с помощью программы «Hydra Web v1.6.1»¹. Автоматически были собраны консенсусные НП с порогом чувствительности к минорным популяциям 20, 15, 10 и 5% (NGS20, NGS15, NGS10 и NGS5 соответственно).

Для полученных НП были подсчитаны DB- и SM-индексы в соответствии с методикой, описанной в литературе [2, 8].

DB-индекс рассчитывали как общее число вырожденных нуклеотидных оснований в области RT (нуклеотидные позиции 2550–3368). В качестве порога величины DB-индекса, свидетельствующего о факте двойной ВИЧ-инфекции, проверялись два значения: 34 и 45 [2].

SM-индекс рассчитывали по формуле:

$$SM = X/372,$$

где SM — индекс синонимичности, X — общее число синонимичных замен в исследуемом фрагменте генома, 372 — общее число аминокислот, кодированных фрагментом PR-RT гена *pol* (нуклеотидные позиции 2253–3368). Возможными порогами SM-индекса были выбраны значения 0,05 и 0,08 [8].

Статистический анализ различий величин DB- и SM-индексов, полученных с помощью разных технологий и для различных модельных образцов, проводили через расчёт *t*-критерия Стьюдента. Для анализа качественных показателей (эффективности выявления двойной ВИЧ-инфекции) использовали точный двусторонний критерий Фишера [19]. Различия считали достоверными при $p < 0,01$.

Формирование OTUs для результатов NGS проводили для 1 из 4 фрагментов, кодирующих часть обратной транскриптазы (нуклеотидные позиции 2725–2981) в соответствии с рекомендациями². Филогенетический анализ по методу максимального правдоподобия (Maximum Likelihood), а также поиск оптимальной модели нуклеотидных замен для полученных OTUs проводили в программе «Mega 6.0». В качестве референтных были использованы следующие НП из международной базы данных GenBank: K03455 и AY819715 (субтип В), AY500393 и EU861977 (субсубтип А6), AY829204 и JN230353 (CRF63_02A1). Также вместе с OTUs модельных образцов были проанализированы варианты OTUs, полученные для контрольных образцов, используемых для создания данных моделей двойной ВИЧ-инфекции.

Результаты

Анализ DB- и SM-индексов в моделях двойной ВИЧ-инфекции

Нами отмечена зависимость величины DB- и SM-индексов не только от того, какие вирусные ва-

¹ URL: <https://hydra.canada.ca/pages/home?lang=en-CA>

² URL: <https://www.drive5.com/usearch/manual/otus.html>

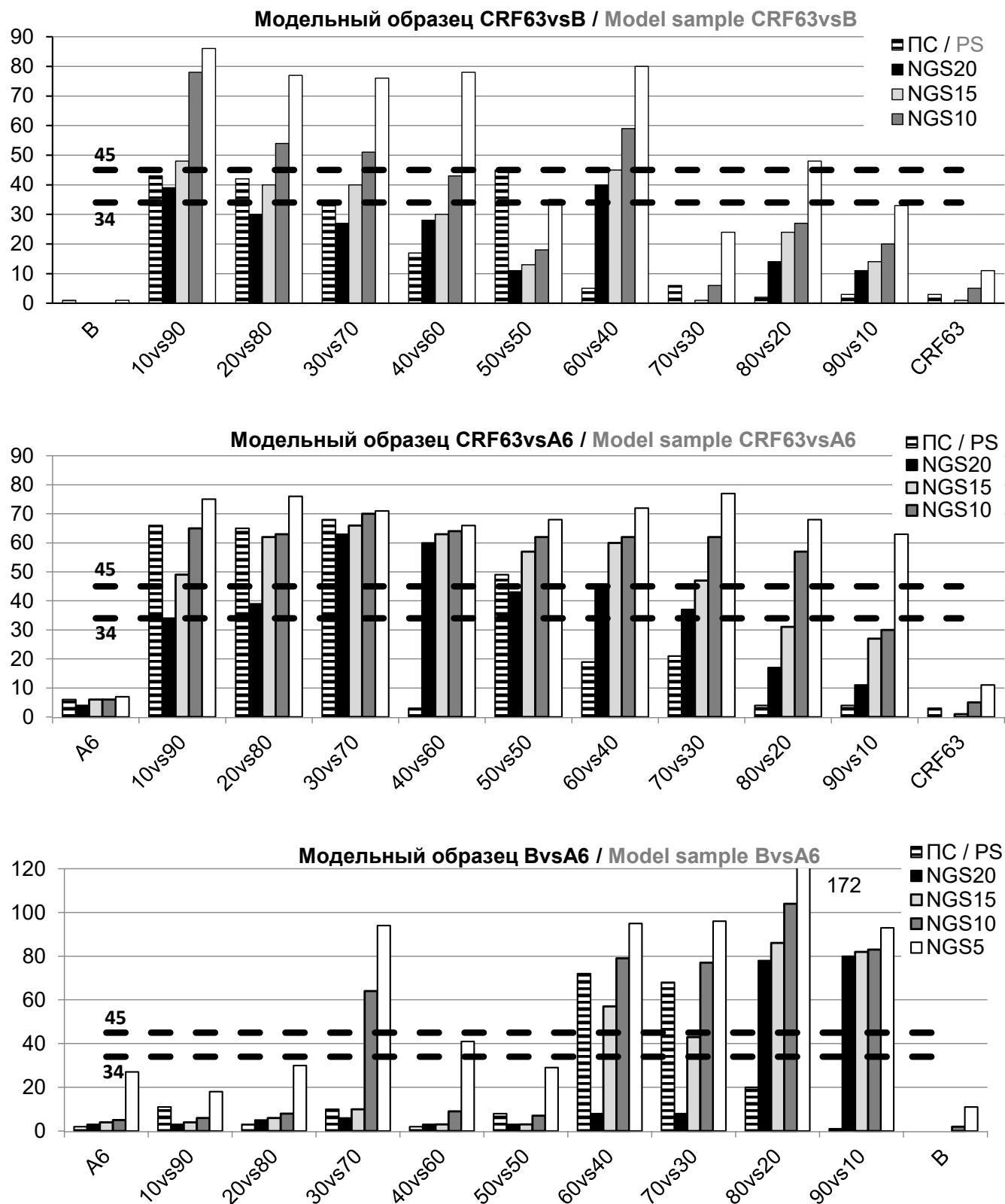


Рис. 1. Значения DB-индекса, полученные при использовании технологий ПС и NGS20–NGS5 для модельных образцов двойной ВИЧ-инфекции CRF63vsB, CRF63vsA6 и BvsA6.

Горизонтальными штрихованными линиями обозначены заданные пороговые значения индекса.

Fig. 1. DB counts obtained by using PS and NGS20-NGS5 technologies for CRF63vsB, CRF63vsA6, and BvsA6 model samples of dual HIV infection.

Horizontal hatched lines indicate the specified threshold values for the count.

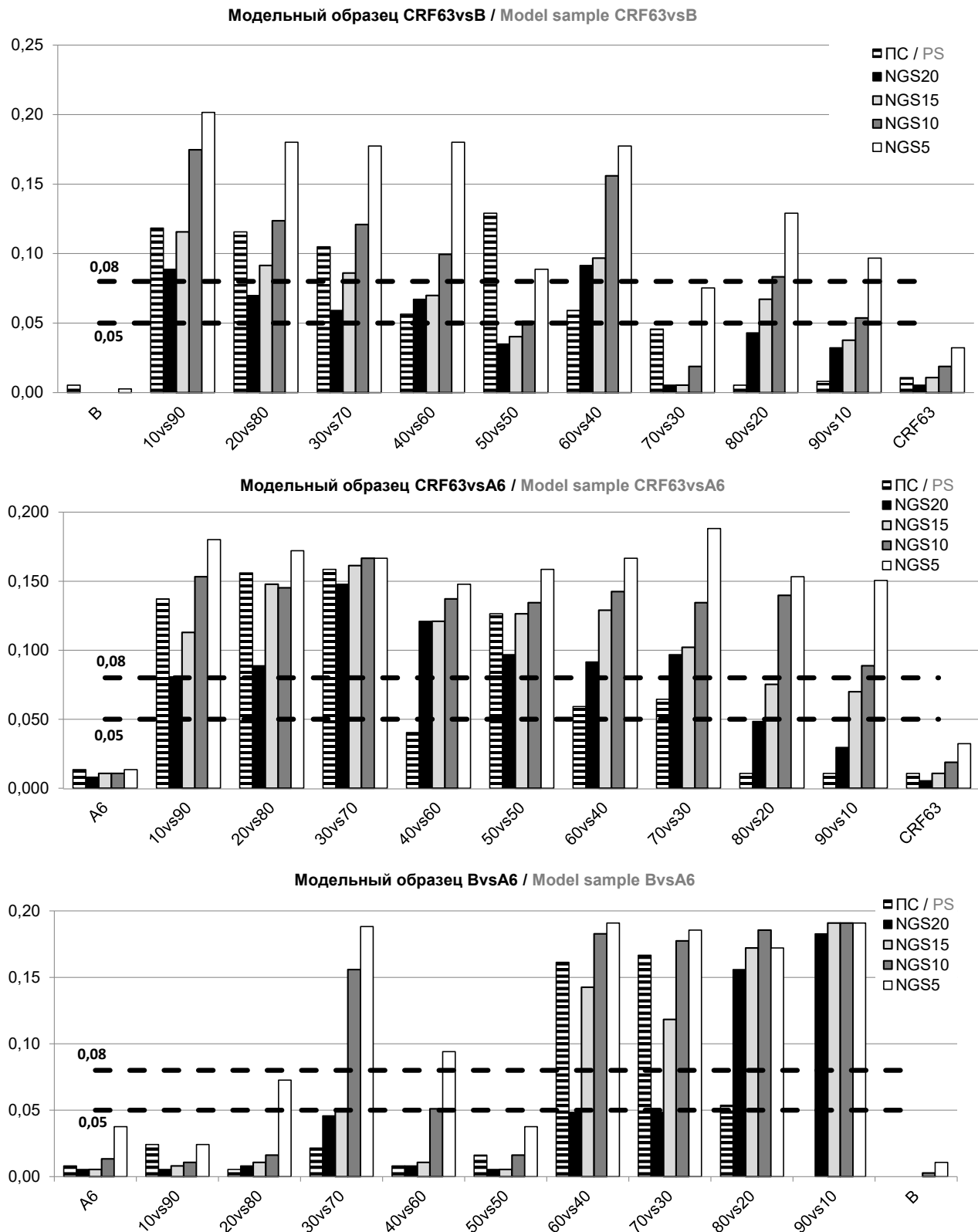


Рис. 2. Значения SM-индекса, полученные при использовании технологий ПС и NGS20–NGS5 для модельных образцов двойной ВИЧ-инфекции CRF63vsB, CRF63vsA6 и BvsA6.

Горизонтальными штрихованными линиями обозначены заданные пороговые значения индекса.

Fig. 2. SM counts obtained by using PS and NGS20–NGS5 technologies for CRF63vsB, CRF63vsA6, and BvsA6 model samples of dual HIV infection.

Horizontal hatched lines indicate the specified threshold values for the count.

рианты присутствовали в смеси, но и от их соотношения (рис. 1, 2). Величины обоих индексов для модельных образцов BvsA6, содержащих в качестве минорного варианта субсубтип A6, были выше, чем у образцов, содержащих минорные количества вируса субтипа В. Аналогичный эффект был отмечен для моделей CRF63vsB и CRF63vsA6, в которых в минорных количествах присутствовал рекомбинантный вирус. Это говорит о «доминировании» вируса субсубтипа A6 в моделях BvsA6 и CRF63 — в моделях CRF63vsB и CRF63vsA6, что снижало степень вырожденности в полученных НП.

Как ожидалось, величины DB- и SM-индексов в НП исследованных моделей, полученные с помощью NGS, в основном оказались выше, чем в НП, полученных методом ПС. Так, средняя величина DB-индекса для всех модельных образцов, полученных с помощью ПС, составила 25,59 (95% ДИ 15,60–35,54), в то время как для NGS20, NGS15, NGS10, NGS5 — 27,48 (95% ДИ 18,27–36,69), 37,44 (95% ДИ 27,56–47,33), 49,19 (95% ДИ 38,17–60,20) и 68,19 (95% ДИ 55,81–80,56) соответственно. Тем не менее статистически достоверные различия ($p < 0,01$) в уровне DB-индекса были обнаружены лишь при сравнении ПС или NGS20 с NGS10 и NGS5, а также между NGS15 и NGS5.

Также было отмечено значительное возрастание среднего значения SM-индекса с увеличением чувствительности технологии секвенирования: для ПС оно составило 0,069 (95% ДИ 0,046–0,092), а для NGS20, NGS15, NGS10, NGS5 — 0,067 (95% ДИ 0,048–0,086), 0,088 (95% ДИ 0,066–0,109), 0,115 (95% ДИ 0,092–0,138) и 0,146 (95% ДИ 0,126–0,166) соответственно. Как и в случае DB-индекса, статистически достоверными были различия между ПС или NGS20 и NGS10–NGS5. Однако уже между результатами NGS15 и NGS10 имелись достоверные различия, что говорит о большей эффективности технологии NGS при анализе SM-индекса.

При этом такое значительное увеличение степени вырожденности от ПС к NGS5 касалось смесей вирусов, но не контрольных образцов, содержащих только A6, B или CRF06_02A1. Средний DB-индекс, полученный для контрольных образцов методом ПС, составил 2,50 (95% ДИ 1,68–3,32), а для NGS20, NGS15, NGS10 и NGS5 — 1,17 (95% ДИ 0,44–1,89), 2,00 (95% ДИ 1,03–2,97), 3,83 (95% ДИ 2,97–4,75) и 11,33 (95% ДИ 7,92–14,74) соответственно. Средний SM-индекс для ПС и всех вариантов NGS составил 0,008 (95% ДИ 0,006–0,010), 0,004 (95% ДИ 0,003–0,005), 0,006 (95% ДИ 0,004–0,008), 0,011 (95% ДИ 0,008–0,014) и 0,022 (95% ДИ 0,016–0,027) соответственно. Данные различия между технологиями секвенирования были статистически незначимы ($p > 0,01$). Ни в одном случае DB- или SM-индекс, полученный для контрольных образцов любой технологией, не преодолевал минимальное пороговое зна-

чение, описанное в литературе [2, 8] для данного анализа, — 34 для DB-индекса и 0,05 для SM-индекса.

В то же время рост вычисляемых индексов с увеличением чувствительности технологии секвенирования позволил выявить больше вариантов моделей двойной ВИЧ-инфекции. Так, пороговое значение DB-индекса 34 смогли преодолеть в общей сложности только 10 из всех 27 вариантов моделей, анализируемых ПС, в то время как при использовании NGS20–NGS5 это число составило 11, 15, 18 и 22 соответственно. При использовании порогового значения 0,05 для SM-индекса двойная ВИЧ-инфекция была выявлена в 15, 14, 20, 23 и 25 вариантах для ПС и NGS20–NGS5 соответственно. Самые низкие значения вычисляемых индексов (а значит — и вероятность выявления двойной ВИЧ-инфекции) были получены для смесей BvsA6. При использовании DB-индекса статистически достоверными были различия лишь между ПС и NGS5, а при использовании SM-индекса — между ПС или NGS20 и NGS10–NGS5, что вновь свидетельствует о большей эффективности применения SM-индекса для выявления двойной ВИЧ-инфекции.

Несмотря на более высокую чувствительность технологии NGS по сравнению с ПС, при анализе среднего значения SM-индекса отдельно для каждого типа моделей отмечалось незначительное снижение этого показателя в смесях CRF63vsB у NGS20 и NGS15 по сравнению с ПС (0,055 и 0,068 против 0,071 соответственно) (рис. 3).

Также NGS20 незначительно занизило средний DB-индекс для моделей BvsA6 по сравнению с ПС — 21,56 против 21,67.

Анализ OTUs

В среднем для каждого из 9 вариантов модельных образцов групп BvsA6, CRF63vsB и CRF63vsA6 было получено 8, 9 и 11 вариантов OTUs соответственно. В качестве оптимального порога схожести ридов был выбран порог 90%. При использовании пороговых значений выше 90% отмечалась генерация большого количества OTUs с неясными результатами последующего филогенетического анализа. При снижении порогового значения число вариантов OTUs сильно сокращалось, снижая достоверность последующего анализа.

Выявлена корреляция результатов кластеризации исследуемых OTUs с результатами анализа DB- и SM-индексов. Кроме того, распределение вариантов OTUs было очень неравномерным для разных вирусных вариантов: в исследуемых моделях BvsA6 77,78% OTUs относились к A6 и лишь 22,22% — к субтипу В. В моделях CRF63vsB 69,27% OTUs относились к рекомбинанту, 11,11% — к субтипу В, а 19,63% вариантов OTUs дали спорный результат, образуя с низкой достоверностью кластеры с различными референтными НП (в основном с A6).

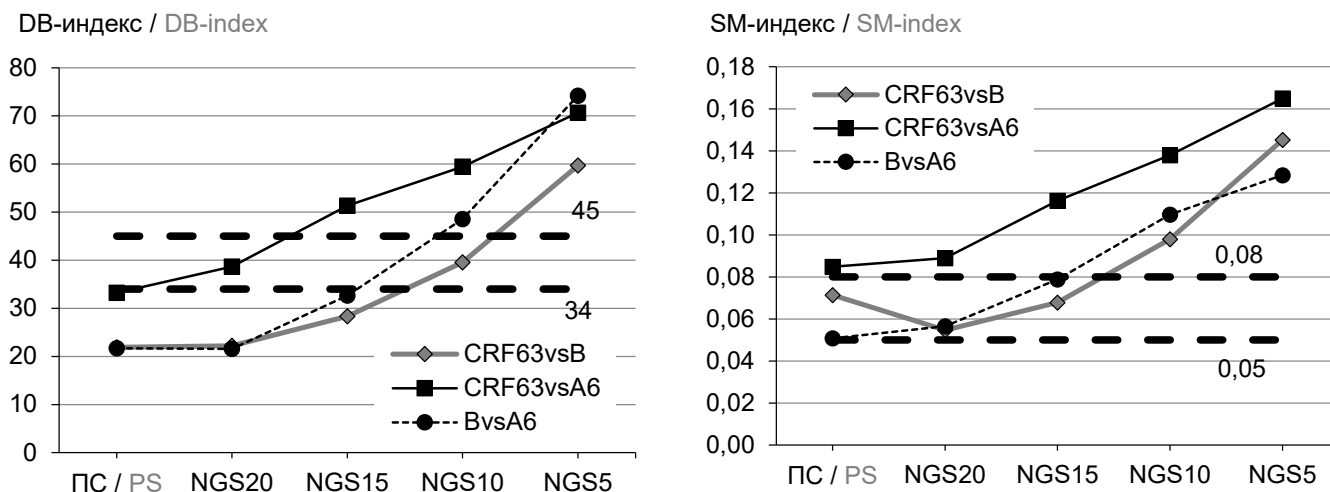


Рис. 3. Средний уровень DB- и SM-индексов, полученный при использовании технологий ПС и NGS20–NGS5 для модельных образцов двойной ВИЧ-инфекции CRF63vsB, CRF63vsA6 и BvsA6.

Горизонтальными штрихованными линиями обозначены заданные пороговые значения для DB- и SM-индексов.

Fig. 3. The average DB and SM counts estimated with PS and NGS20–NGS5 methods for CRF63vsB, CRF63vsA6, and BvsA6 model samples of dual HIV infection.

Horizontal hatched lines indicate the specified threshold values for DB and SM counts.

В моделях CRF63vsA6 к рекомбинанту, субсубтипу А6 относились 57,10 и 41,15% OTUs соответственно. При этом 1,75% OTUs дали спорный результат.

Результаты анализа OTUs, полученных для моделей двойной ВИЧ-инфекции с долей каждого вируса 30 и 70%, представлены на **рис. 4**. Мы не обнаружили строгой корреляции между результатами генотипирования вариантов OTUs и долей вируса в образце. Так, для CRF63vsA6(70vs30) 7 вариантов OTUs были близки к CRF63, а 4 — к А6. В то же время OTUs для CRF63vsA6(30vs70) распределились между CRF63 и А6 примерно поровну.

Схожие результаты показал и анализ CRF63vsB. Распределение OTUs между CRF63 и В для CRF63vsB(30vs70) составило 9 к 4, а для CRF63vsB(70vs30) — 9 к 2. Однако анализ модельных образцов BvsA6 продемонстрировал противоположный результат: в образце BvsA6(30vs70) к субсубтипу А6 относились 6 OTUs, а к субтипу В — 3, в то время как в образце BvsA6(70vs30) к А6 и В были отнесены 7 и 2 OTUs соответственно.

Тем не менее результаты генотипирования OTUs, полученных для моделей двойной ВИЧ-инфекции, отличались от таковых для контрольных образцов А6, В и CRF63_02A1, для которых все полученные варианты OTUs достоверно относились к соответствующему генетическому варианту.

Обсуждение

Нами впервые в России была валидирована методика анализа НП ВИЧ-1, полученных методом классического секвенирования и NGS для анали-

за такого редкого, но крайне важного явления, как двойная ВИЧ-инфекция.

В своём исследовании мы изучили модельные образцы двойной ВИЧ-инфекции, обусловленной одновременным присутствием в клинических образцах наиболее важных для России с эпидемиологической точки зрения вирусных вариантов. ВИЧ-1 субсубтипа А6 доминирует в России, в то время как рекомбинантный вариант CRF63_02A1 активно распространяется в стране в последние годы [20–22]. Также нами исследован вирус субтипа В как референтный, наиболее распространённый в странах Западной Европы и используемый для валидации методики оценки двойной ВИЧ-инфекции [2, 8, 20].

Применение анализа НП для выявления двойной ВИЧ-инфекции не только менее трудоёмко и экономически выгодно по сравнению с технологией SGS, но и позволяет проводить скрининг двойной ВИЧ-инфекции аналогично анализу лекарственной устойчивости. В нашем исследовании применение расчёта DB- и SM-индексов в последовательностях PR-RT, полученных методом ПС, позволяло выявлять двойную ВИЧ-инфекцию только в 37 и 55,56% случаев соответственно.

Наши результаты были хуже полученных зарубежными авторами. Так, расчёт DB-индекса потенциально позволяет выявить 43,2% образцов двойной ВИЧ-инфекции [2], а расчёт SM-индекса — 100% образцов [8]. Однако в исследовании зарубежных коллег анализу подвергались более длинные фрагменты PR-RT, чем в нашем исследовании: 335 [2] и 434 [8] аминокислоты при расчёте DB- и SM-индексов против 273 и 372 аминокислот в на-

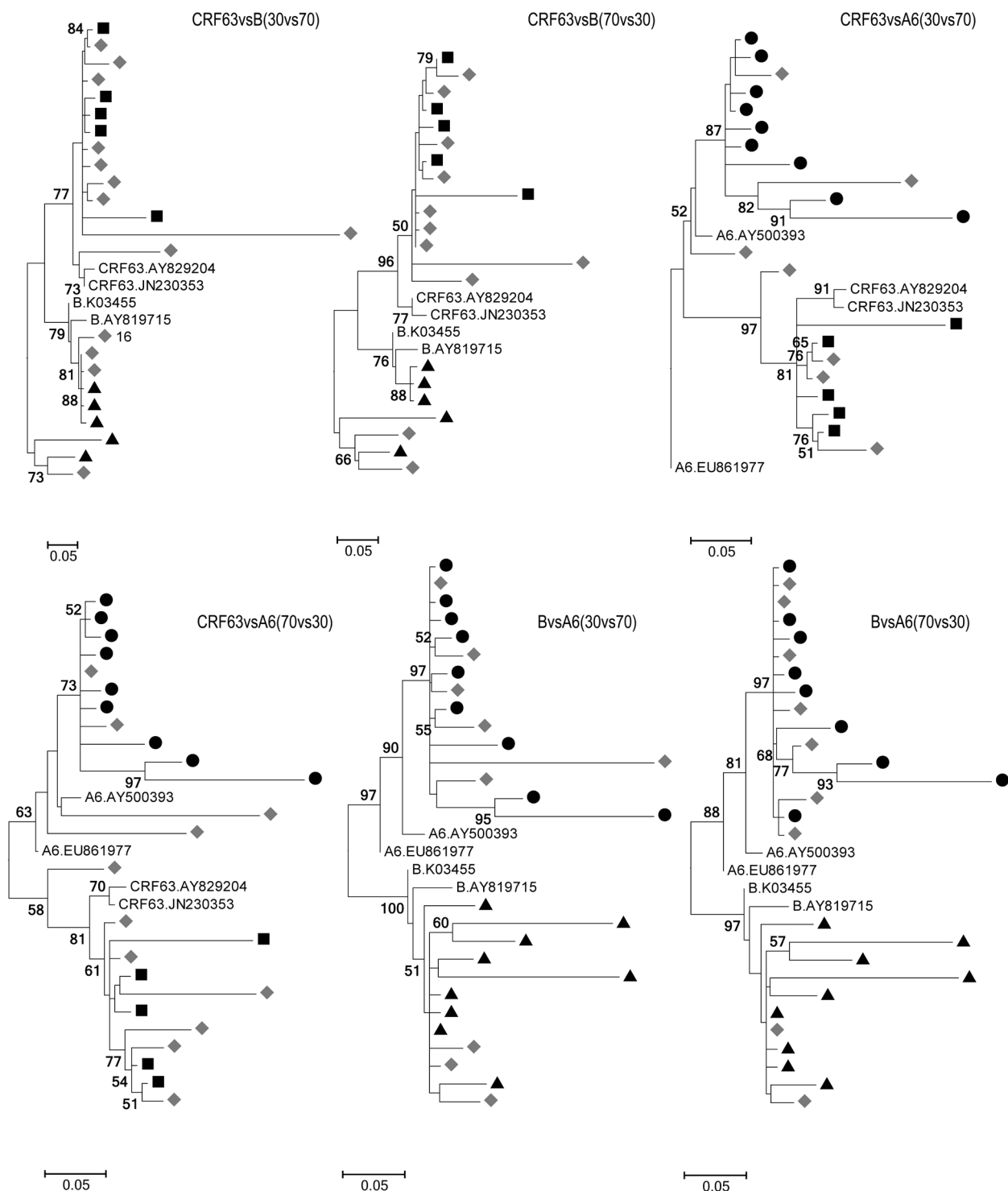


Рис. 4. Результаты филогенетического анализа фрагмента области RT (положения 2725–2981) модельных образцов двойной ВИЧ-инфекции и контрольных образцов, выполненный по методу максимального правдоподобия (Maximum Likelihood) с использованием GTR+G модели нуклеотидных замен в 1000 независимых построениях (bootstrap level). Достоверность кластеров $\geq 50\%$ (в %) указана рядом с ними. Серыми ромбами выделены варианты OTUs, полученные для данного модельного образца. Последовательности OTUs, полученные для контрольного образца субсубтипа A6, обозначены чёрными кружками, для образца субтипа B — чёрными треугольниками, для CRF63_02A1 — чёрными квадратами.

Fig. 4. Results of the phylogenetic analysis of the fragment from the RT region (positions 2725–2981) of dual HIV infection model samples and control samples; the analysis was based on the maximum likelihood method and used the GTR+G model of nucleotide substitutions in 1,000 bootstrap replicates.

The statistical significance of clusters $\geq 50\%$ is shown next to them. Grey diamonds indicate OTU variants obtained for the model sample. The OTU sequences obtained for the control sample of sub-subtype A6 are shown by black circles; the subtype B sample is shown by black triangles; black squares represent CRF63_02A1.

шем исследовании соответственно. Более короткие фрагменты содержат меньшее число потенциально вырожденных позиций. К тому же в исследовании М. Rasold и соавт. [8] при расчёте SM-индекса ошибочно были причислены к образцам двойной ВИЧ-инфекции несколько образцов с моноинфекцией, в то время как ни в одном анализе, проведённом нами, подобное не наблюдалось.

Наши результаты демонстрируют, что применение технологии NGS с порогом чувствительности к минорным вариантам 5–10% позволяет выявлять двойную ВИЧ-инфекцию более эффективно, чем классическое секвенирование. Наиболее эффективным для выявления межсубтипной двойной ВИЧ-инфекции в исследованной области гена *pol* (положения 2253–3368) является применение технологии NGS с 5% порогом чувствительности к минорным вариантам и с оценкой SM-индекса с пороговым значением для двойной инфекции 0,05. Данные параметры анализа позволяют выявить максимальное количество случаев двойной ВИЧ-инфекции (в 25 из 27 модельных образцов).

Несмотря на то что чувствительность классического секвенирования к минорным вирусным вариантам в образце обычно оценивают в 20% [16], NGS с таким же порогом чувствительности хуже выявляло вырожденность в некоторых моделях двойной ВИЧ-инфекции. С одной стороны, такое свойство NGS20 минимизирует число ошибок и артефактов, получаемых в результате секвенирования, что оптимально для получения полногеномных последовательностей вируса [11, 17]. С другой стороны, при использовании NGS20 возникает опасность упустить вырожденность, связанную с двойной ВИЧ-инфекцией в образце.

Для большинства модельных образцов применение метода анализа OTUs участка генома с позициями 2725–2981 оказалось эффективным, что подтверждается формированием на дендрограммах достоверных кластеров (>80%) с соответствующими контрольными и референтными последовательностями. Наши результаты схожи с данными, полученными при исследовании двойной ВИЧ-инфекции среди MSM в Испании [9]. Однако было отмечено смещение соотношения доли OTUs, не соответствующее доле вирусов в модельных образцах. В частности, в смесях 63vsB и BvsA6 большинство полученных OTUs генотипировались как CRF63_02A1 и A6 соответственно. Основным объяснением этого может быть тот факт, что степень дивергенции вирусов субсубтипа A6 и CRF63_02A1 значительно больше, чем у субтипа B. При использовании порогового значения 90% риды субтипа B удаляются автоматически. Этот несомненный недостаток данной методики должен быть учтён при изучении двойной инфекции, вызванной разными вариантами ВИЧ. Кроме того, такое смещение ре-

зультатов OTUs может говорить о том, что применяемые в работе системы для амплификации и/или секвенирования амплифицируют и секвенируют различные вирусы с разной эффективностью. В результате, сигнал от более эффективно выявляемого вируса подавляет сигнал от другого варианта. Подобная неравномерная чувствительность к разным вирусным вариантам была отмечена ранее при сравнении ПЦР-наборов для оценки вирусной нагрузки ВИЧ-1 [23].

Тем не менее, несмотря на все недостатки метода анализа OTUs, он позволяет достоверно дифференцировать двойную ВИЧ-инфекцию от моноинфекции в большинстве модельных образцов и может быть использован в дальнейших исследованиях множественного инфицирования ВИЧ.

Стоит отметить тот факт, что активное применение классического секвенирования и NGS делает эти технологии более доступными, снижая время проведения и цену анализа по сравнению с методикой SGS. Так, цена проведённого нами анализа одного образца с применением классического секвенирования составила около 10 000 руб., что практически в 2 раза дешевле такого же исследования, проведённого в 2010 г. [8]. Благодаря своей гигантской производительности, NGS оказывается ещё более дешёвой технологией: цена анализа исследуемого геномного фрагмента каждого образца в нашем исследовании составляла около 5000 руб., что ниже стоимости аналогичного анализа NGS в 2010 г. почти в 5 раз [8].

Заключение

Наши результаты говорят о пользе технологии NGS для исследования феномена двойной ВИЧ-инфекции, демонстрируя высокую чувствительность анализа. Таким образом, внедрение в рутинную практику этой технологии позволит не только более эффективно выявлять генетические особенности инфекционных агентов, но и получать больше данных для более глубокого анализа эпидемиологической ситуации.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Лаповок И.А., Лопатухин А.Э., Киреев Д.Е. Двойная ВИЧ-инфекция: эпидемиология, клиническая значимость и диагностика. *Инфекционные болезни*. 2019; 17(2): 87–93. <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2019-2-87-93>
2. Cornelissen M., Jurriaans S., Kozaczynska K., Prins J.M., Hamidjaja R.A., Zorgdrager F., et al. Routine HIV-1 genotyping as a tool to identify dual infections. *AIDS*. 2007; 21(7): 807–11. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3280f3c08a>
3. Soares de Oliveira A.C., Pessoa de Farias R., da Costa A.C., Melillo Sauer M., Bassichetto K.C., Santos Oliveira S.M., et al. Frequency of subtype B and F1 dual infection in HIV-1 positive, Brazilian men who have sex with men. *Viol. J.* 2012; 9: 223. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-223>
4. Redd A.D., Ssemwanga D., Vandepitte J., Wendel S.K., Ndembi N., Bukunya J., et al. The rates of HIV-1 superinfection and

- primary HIV-1 infection are similar in female sex workers in Uganda. *AIDS*. 2014; 28(14): 2147–52. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000365>
5. Luan H., Han X., Yu X., An M., Zhang H., Zhao B., et al. Dual infection contributes to rapid disease progression in men who have sex with men in China. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2017; 75(4): 480–7. <https://doi.org/10.1097/qai.0000000000001420>
6. Лаповок И.А., Салеева Д.В., Кириченко А.А., Мурзакова А.В., Лопатухин А.Э., Киреев Д.Е. Исследование частоты встречаемости двойной ВИЧ-инфекции в России. *Инфекционные болезни*. 2020; 18(4): 138–48. <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2020-4-138-148>
7. Gao Y., Tian W., Han X., Gao F. Immunological and virological characteristics of human immunodeficiency virus type 1 superinfection: implications in vaccine design. *Front. Med.* 2017; 11(4): 480–9. <https://doi.org/10.1007/s11684-017-0594-8>
8. Pacold M., Smith D., Little S., Cheng P.M., Jordan P., Ignacio C., et al. Comparison of methods to detect HIV dual infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2010; 26(12): 1291–8. <https://doi.org/10.1089/aid.2010.0042>
9. Casado C., Pernas M., Rava M., Ayerdi O., Vera M., Alenda R., et al. High-risk sexual practices contribute to HIV-1 double infection among men who have sex with men in Madrid. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2020; 36(11): 896–904. <https://doi.org/10.1089/AID.2020.0068>
10. Popescu B., Banica L., Nicolae I., Radu E., Niculescu I., Abagiu A., et al. NGS combined with phylogenetic analysis to detect HIV-1 dual infection in Romanian people who inject drugs. *Microbes Infect.* 2018; 20(5): 308–11. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2018.03.004>
11. Kireev D.E., Lopatukhin A.E., Murzakova A.V., Pimkina E.V., Speranskaya A.S., Neverov A.D., et al. Evaluating the accuracy and sensitivity of detecting minority HIV-1 populations by Illumina next-generation sequencing. *J. Virol. Methods*. 2018; 261: 40–5. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.08.001>
12. Yerly S., Jost S., Monnat M., Telenti A., Cavassini M., Chave J.P., et al. HIV-1 co/super-infection in intravenous drug users. *AIDS*. 2004; 18(10): 1413–21. <https://doi.org/10.1097/01.aids.0000131330.28762.0c>
13. Ring K., Muir D., Mackie N., Bailey A.C. HIV-1 superinfection in a patient with known HIV-2 – A case report. *Int. J. STD AIDS*. 2020; 31(3): 271–3. <https://doi.org/10.1177/0956462420901969>
14. Wagner G.A., Pacold M.E., Kosakovsky P.S., Caballero G., Chaillon A., Rudolph A.E., et al. Incidence and prevalence of intrasubtype HIV-1 dual infection in at-risk men in the United States. *J. Infect. Dis.* 2014; 209(7): 1032–8. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit633>
15. Van der Kuyl A.C., Cornelissen M. Identifying HIV-1 dual infections. *Retrovirology*. 2007; 4: 67. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-4-67>
16. Inzaule S.C., Hamers R.L., Noguera-Julian M., Casadellà M., Parera M., Kityo C., et al. Clinically relevant thresholds for ultrasensitive HIV drug resistance testing: a multi-country nested case-control study. *Lancet HIV*. 2018; 5(11): e638–46. [https://doi.org/10.1016/S2352-3018\(18\)30177-2](https://doi.org/10.1016/S2352-3018(18)30177-2)
17. Кириченко А.А., Свиридова А.А., Лопатухин А.Э., Мурзакова А.В., Лаповок И.А., Голгарь И.А. и др. Корреляция результатов высокопроизводительного и классического методов секвенирования при анализе лекарственной устойчивости вируса иммунодефицита человека у пациентов на фоне неэффективной антиретровирусной терапии. *Инфекционные болезни*. 2019; 17(2): 12–9. <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2019-2-12-19>
18. Trabaud M.A., Icard V., Ramière C., Tardy J.C., Scholtes C., André P. Comparison of HIV-1 drug-resistance genotyping by ultra-deep sequencing and sanger sequencing using clinical samples. *J. Med. Virol.* 2017; 89(11): 1912–9. <https://doi.org/10.1002/jmv.24872>
19. Герасимов А.Н. *Медицинская статистика: учебное пособие*. М.: МИА; 2007.
20. Foley B.T., Leitner T., Paraskevis D., Peeters M. Primate immunodeficiency virus classification and nomenclature: Review. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 46: 150–8. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.10.018>
21. Лаповок И.А., Лопатухин А.Э., Киреев Д.Е., Казеннова Е.В., Лебедев А.В., Бобкова М.Р. и соавт. Молекулярно-эпидемиологический анализ вариантов ВИЧ-1, циркулировавших в России в 1987–2015 гг. *Терапевтический архив*. 2017; 89(11): 44–9. <https://doi.org/10.17116/terarkh2017891144-49>
22. Baryshev P., Bogachev V., Gashnikova N. HIV-1 genetic diversity in Russia: CRF63_02A1, a new HIV type 1 genetic variant spreading in Siberia. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2014; 30(6): 592–7. <https://doi.org/10.1089/AID.2013.0196>
23. Holmes H., Davis C., Heath A. Development of the 1st International Reference Panel for HIV-1 RNA genotypes for use in nucleic acid-based techniques. *J. Virol. Methods*. 2008; 154(1-2): 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.08.014>

REFERENCES

- Lapovok I.A., Lopatukhin A.E., Kireev D.E. Dual HIV infection: epidemiology, clinical significance, and diagnosis. *Infektsionnye bolezni*. 2019; 17(2): 87–93. <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2019-2-87-93> (in Russian)
- Cornelissen M., Jurriaans S., Kozaczynska K., Prins J.M., Hamidjaja R.A., Zorgdrager F., et al. Routine HIV-1 genotyping as a tool to identify dual infections. *AIDS*. 2007; 21(7): 807–11. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3280f3c08a>
- Soares de Oliveira A.C., Pessoa de Farias R., da Costa A.C., Melillo Sauer M., Bassichetto K.C., Santos Oliveira S.M., et al. Frequency of subtype B and F1 dual infection in HIV-1 positive, Brazilian men who have sex with men. *Virol. J.* 2012; 9: 223. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-223>
- Redd A.D., Ssemwanga D., Vandepitte J., Wendel S.K., Ndembi N., Bukonya J., et al. The rates of HIV-1 superinfection and primary HIV-1 infection are similar in female sex workers in Uganda. *AIDS*. 2014; 28(14): 2147–52. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000365>
- Luan H., Han X., Yu X., An M., Zhang H., Zhao B., et al. Dual infection contributes to rapid disease progression in men who have sex with men in China. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2017; 75(4): 480–7. <https://doi.org/10.1097/qai.0000000000001420>
- Lapovok I.A., Saleeva D.V., Kirichenko A.A., Murzakova A.V., Lopatukhin A.E., Kireev D.E. The study of dual HIV infection prevalence in Russia. *Infektsionnye bolezni*. 2020; 18(4): 138–48. <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2020-4-138-148> (in Russian)
- Gao Y., Tian W., Han X., Gao F. Immunological and virological characteristics of human immunodeficiency virus type 1 superinfection: implications in vaccine design. *Front. Med.* 2017; 11(4): 480–9. <https://doi.org/10.1007/s11684-017-0594-8>
- Pacold M., Smith D., Little S., Cheng P.M., Jordan P., Ignacio C., et al. Comparison of methods to detect HIV dual infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2010; 26(12): 1291–8. <https://doi.org/10.1089/aid.2010.0042>
- Casado C., Pernas M., Rava M., Ayerdi O., Vera M., Alenda R., et al. High-risk sexual practices contribute to HIV-1 double infection among men who have sex with men in Madrid. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2020; 36(11): 896–904. <https://doi.org/10.1089/AID.2020.0068>
- Popescu B., Banica L., Nicolae I., Radu E., Niculescu I., Abagiu A., et al. NGS combined with phylogenetic analysis to detect HIV-1 dual infection in Romanian people who inject drugs. *Microbes Infect.* 2018; 20(5): 308–11. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2018.03.004>
- Kireev D.E., Lopatukhin A.E., Murzakova A.V., Pimkina E.V., Speranskaya A.S., Neverov A.D., et al. Evaluating the accuracy

- and sensitivity of detecting minority HIV-1 populations by Illumina next-generation sequencing. *J. Virol. Methods*. 2018; 261: 40–5. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.08.001>
12. Yerly S., Jost S., Monnat M., Telenti A., Cavassini M., Chave J.P., et al. HIV-1 co/super-infection in intravenous drug users. *AIDS*. 2004; 18(10): 1413–21. <https://doi.org/10.1097/01.aids.0000131330.28762.0c>
 13. Ring K., Muir D., Mackie N., Bailey A.C. HIV-1 superinfection in a patient with known HIV-2 – A case report. *Int. J. STD AIDS*. 2020; 31(3): 271–3. <https://doi.org/10.1177/0956462420901969>
 14. Wagner G.A., Pacold M.E., Kosakovsky P.S., Caballero G., Chaillon A., Rudolph A.E., et al. Incidence and prevalence of intrasubtype HIV-1 dual infection in at-risk men in the United States. *J. Infect. Dis*. 2014; 209(7): 1032–8. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit633>
 15. Van der Kuyl A.C., Cornelissen M. Identifying HIV-1 dual infections. *Retrovirology*. 2007; 4: 67. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-4-67>
 16. Inzaule S.C., Hamers R.L., Noguera-Julian M., Casadellà M., Parera M., Kityo C., et al. Clinically relevant thresholds for ultrasensitive HIV drug resistance testing: a multi-country nested case-control study. *Lancet HIV*. 2018; 5(11): e638–46. [https://doi.org/10.1016/S2352-3018\(18\)30177-2](https://doi.org/10.1016/S2352-3018(18)30177-2)
 17. Kirichenko A.A., Sviridova A.A., Lopatukhin A.E., Murzakova A.V., Lapovok I.A., Goptar' I.A., et al. Correlation of results analysis drug resistance of human immunodeficiency virus among patients with virological failure by next-generation sequencing and traditional population sequencing. *Infektsionnye bolezni*. 2019; 17(2): 12–9. <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2019-2-12-19> (in Russian)
 18. Trabaud M.A., Icard V., Ramière C., Tardy J.C., Scholtes C., André P. Comparison of HIV-1 drug-resistance genotyping by ultra-deep sequencing and sanger sequencing using clinical samples. *J. Med. Virol.* 2017; 89(11): 1912–9. <https://doi.org/10.1002/jmv.24872>
 19. Gerasimov A.N. *Medical Statistics: A Textbook [Meditsinskaya statistika: Uchebnoe posobie]*. Moscow: MIA; 2007. (in Russian)
 20. Foley B.T., Leitner T., Paraskevis D., Peeters M. Primate immunodeficiency virus classification and nomenclature: Review. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 46: 150–8. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.10.018>
 21. Lapovok I.A., Lopatukhin A.E., Kireev D.E., Kazennova E.V., Lebedev A.V., Bobkova M.R., et al. Molecular epidemiological analysis of HIV-1 variants circulating in Russia in 1987–2015. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2017; 89(11): 44–9. <https://doi.org/10.17116/terarkh2017891144-49> (in Russian)
 22. Baryshev P., Bogachev V., Gashnikova N. HIV-1 genetic diversity in Russia: CRF63_02A1, a new HIV type 1 genetic variant spreading in Siberia. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2014; 30(6): 592–7. <https://doi.org/10.1089/AID.2013.0196>
 23. Holmes H., Davis C., Heath A. Development of the 1st International Reference Panel for HIV-1 RNA genotypes for use in nucleic acid-based techniques. *J. Virol. Methods*. 2008; 154(1-2): 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.08.014>

Информация об авторах

Лоповок Илья Андреевич — к.б.н., с.н.с. Научной группы разработки новых методов диагностики ВИЧ-инфекции и вирусных гепатитов ЦНИИ эпидемиологии, Москва, Россия, i_lapovok@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6328-1415>

Барышев Павел Борисович — к.б.н., биоинформатик Научной группы разработки новых методов диагностики ВИЧ-инфекции и вирусных гепатитов ЦНИИ Эпидемиологии Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3666-2201>

Салеева Дарья Владиславовна — м.н.с., Научной группы разработки новых методов диагностики ВИЧ-инфекции и вирусных гепатитов ЦНИИ эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5870-5594>

Кириченко Алина Алексеевна — н.с. Научной группы разработки новых методов диагностики ВИЧ-инфекции и вирусных гепатитов ЦНИИ эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7116-0138>

Шлыкova (Murzakova) Анастасия Вениаминовна — н.с. Научной группы разработки новых методов диагностики ВИЧ-инфекции и вирусных гепатитов ЦНИИ эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1390-8021>

Киреев Дмитрий Евгеньевич — к.б.н., н.с. Научной группы разработки новых методов диагностики ВИЧ-инфекции и вирусных гепатитов ЦНИИ эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7896-2379>

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 18.08.2021;
принята к публикации 26.10.2021;
опубликована 25.12.2021

Information about the authors

Ilya A. Lapovok — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, HIV and viral hepatitis research group, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, i_lapovok@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6328-1415>

Pavel B. Baryshev — Cand. Sci. (Biol.), bioinformaticist, HIV and viral hepatitis research group, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3666-2201>

Daria V. Saleeva — junior researcher, HIV and viral hepatitis research group, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5870-5594>

Alina A. Kirichenko — researcher, HIV and viral hepatitis research group, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7116-0138>

Anastasiya V. Shlykova (Murzakova) — researcher, HIV and viral hepatitis research group, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1390-8021>

Dmitry E. Kireev — Cand. Sci. (Biol.), researcher, HIV and viral hepatitis research group, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7896-2379>

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 18.08.2021;
accepted for publication 26.10.2021;
published 25.12.2021



Фенотипический профиль актуальных полирезистентных сиквенс-типов (ST 1167, ST 944, ST 208) *Acinetobacter baumannii*

Федотова О.С.¹, Захарова Ю.А.^{1✉}, Остапчук А.В.¹, Бажанова У.А.¹, Захаров А.А.²

¹Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Екатеринбург, Россия;

²Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, Россия

Аннотация

Введение. Ежегодно в мире регистрируют порядка 1 млн случаев инфекций, вызванных *Acinetobacter* spp., что составляет 1,8% всех случаев внутрибольничных инфекций. Клинически значимым представителем рода *Acinetobacter* является *Acinetobacter baumannii*, о чем свидетельствуют результаты многолетних исследований, проведённых в нашей стране и за рубежом. Внутривидовое типирование микроорганизмов является неотъемлемой частью работы клинического микробиолога при расшифровке вспышек гнойно-септических инфекций в рамках эпидемиологического надзора за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи. Большинство практикующих микробиологических лабораторий не имеют возможности использовать генотипические методы типирования в силу высоких финансовых затрат.

Цель — разработка диагностической панели для внутривидовой идентификации *A. baumannii* сиквенс-типов ST 1167, ST 944, ST 208 на основе фенотипических свойств.

Материалы и методы. Изучены внутривидовые признаки 74 штаммов *A. baumannii* из 4 многопрофильных медицинских организаций крупного промышленного центра с использованием генетических (мультилокусное сиквенс-типирование) и комплекса фенотипических методов (биохимические тесты, биоплёнкообразующая способность, зоны задержки роста вокруг дисков с антибактериальными препаратами, чувствительность к анилиновым красителям, дезинфицирующим средствам и ацинетобактерному бактериофагу).

Результаты. Определены фенотипические характеристики 3 ведущих сиквенс-типов *A. baumannii* (ST 1167, 944, 208).

Обсуждение. Сформирован эффективный и экономичный набор дифференцирующих тестов, позволяющих выявить внутривидовые особенности полирезистентных штаммов *A. baumannii* актуальных сиквенс-типов.

Заключение. Диагностическая панель позволит проводить внутривидовую дифференциацию трёх широко представленных сиквенс-типов *A. baumannii* в рамках микробиологического мониторинга инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи.

Ключевые слова: *Acinetobacter baumannii*, внутривидовая характеристика, типирование, фенотипические свойства, сиквенс-тип

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом Екатеринбургского научно-исследовательского института вирусных инфекций (протокол № 5 от 30.06.2017).

Источник финансирования. Работа проводилась в рамках реализации отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора «Проблемно-ориентированные научные исследования в области надзора за инфекционными и паразитарными болезнями на 2016–2020 годы» по теме НИР «Разработка и изучение фармакологических свойств медицинских иммунобиологических препаратов на основе биологически активных веществ, продуцируемых диплоидными клетками животного происхождения. Изучение возможностей использования клеточных культур для биотехнологии» п. 3.1.11. Регистрационный номер в ЕГИСУ НИОКТР АААА-А16-116061710034-6.

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

Для цитирования: Федотова О.С., Захарова Ю.А., Остапчук А.В., Бажанова У.А., Захаров А.А. Фенотипический профиль актуальных полирезистентных сиквенс-типов (ST 1167, ST 944, ST 208) *Acinetobacter baumannii*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(6):639–647.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-170>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-170>

Phenotypic profile of priority multiresistant *Acinetobacter baumannii* sequence types (ST 1167, ST 944, ST 208)

Olga S. Fedotova¹, Yulia A. Zakharova^{1✉}, Anna V. Ostapchuk¹,
Ulyana A. Bazhanova¹, Aleksander A. Zakharov²

¹Ekaterinburg Research Institute of Viral Infections, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Yekaterinburg, Russia;

²D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia

Introduction. About 1,000,000 cases of infections caused by *Acinetobacter* spp. per year are registered globally, making up 1.8% of all the cases of hospital-acquired infections. In compliance with long-term studies carried out in this country and abroad, *Acinetobacter baumannii* is a clinically important representative of the *Acinetobacter* genus. Intraspecific typing of microorganisms is an integral part of a clinical microbiologist's contribution to scoring the outbreaks of purulent-septic infections within the sphere of HAI surveillance. Most of the practicing microbiological laboratories cannot use genotypic typing methods because of their high costs.

Objective. Developing a test panel for intraspecific identification of *A. baumannii* sequence types (ST 1167, ST 944, ST 208) based on their phenotypic properties.

Materials and methods. Intraspecific membership of 74 *A. baumannii* strains obtained from four multipurpose health settings of a large industrial centre was studied using a genetic method (multilocus sequence typing) and a suite of phenotypic methods (biochemical tests, biofilmogenous capacity, growth inhibition zones to antibacterial drugs, sensitivity to aniline dyes, disinfectants and *Acinetobacter* bacteriophage) was studied.

Results. Phenotypic features of three predominant *A. baumannii* sequence types (ST 1167, 944, 208) were determined.

Discussion. An efficacious economy set of differentiating tests allowing identification of intraspecific features of *A. baumannii* multiresistant strains was created.

Conclusion. The test panel will enable the laboratories that cannot use sequencing methods to conduct intraspecific differentiation of common *A. baumannii* sequence types as part of microbiological monitoring.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, intraspecific characteristic, typing, phenotypic properties, sequence type

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Ekaterinburg Research Institute of Viral Infections (protocol No. 5, Juni 30, 2017).

Funding source. The work was carried out within the framework of the Rospotrebnadzor branch research program «Problem-oriented scientific research in the field of surveillance of infectious and parasitic diseases for 2016–2020» on the topic of research «Development and study of the pharmacological properties of medical immunobiological drugs based on biologically active substances produced diploid cells of animal origin. Study of the possibilities of using cell cultures for biotechnology» p. 3.1.11. Registration number in EGISU R&D AAAA-A16-116061710034-6.

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

For citation: Fedotova O.S., Zakharova Yu.A., Ostapchuk A.V., Bazhanova U.A., Zakharov A.A. Phenotypic profile of priority multiresistant *Acinetobacter baumannii* sequence types (ST 1167, ST 944, ST 208). *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(6):639–647. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-170>

Введение

Микроорганизмы, обитающие в стационарах, способны формировать так называемые внутрибольничные популяции, наиболее адаптированные к условиям существования в больничной среде [1]. Широкое распространение инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), в медицинских организациях различного профиля наносит значительный ущерб здоровью населения, экономике и демографической ситуации в стране. Ежегодно в России регистрируют 26–30 тыс. случаев ИСМП, среди которых ведущее место занимают гнойно-септические инфекции (ГСИ) [2–5].

Среди возбудителей ГСИ человека наиболее значимыми являются неферментирующие глюкозу в анаэробных условиях грамотрицательные бактерии [6, 7]. Ежегодно в мире регистрируют 1 млн (600 000–1 400 000) случаев инфекций, вызванных *Acinetobacter* spp., что составляет 1,8% всех случаев внутрибольничных инфекций [8, 9]. Наиболее клинически значимым видом рода *Acinetobacter* является *A. baumannii*, о чём свидетельствуют результаты многолетних исследований, проведённых в нашей стране и за рубежом [6, 10–13].

Самая высокая частота встречаемости возбудителя наблюдается в отделениях реанимации и

интенсивной терапии [14]. Основным резервуаром *A. baumannii* в стационаре являются колонизированные и инфицированные больные. К факторам риска развития инфекции, обусловленной данным патогеном, относят возраст пациентов, наличие онкологических заболеваний, нарушения иммунного статуса, ожоговую болезнь, сепсис [15–17]. Резистентность госпитальных штаммов *A. baumannii* к различным классам антибиотиков, ряду дезинфицирующих средств и антисептиков существенно снижает эффективность лечебно-профилактических мероприятий и приводит к формированию эпидемических очагов ГСИ с высокой летальностью пациентов из перечисленных групп риска [18–20].

Внутривидовая характеристика (типирование) микроорганизмов является неотъемлемой частью работы клинического микробиолога при расшифровке вспышек ГСИ в рамках эпидемиологического надзора за ИСМП. Данный метод позволяет провести сопоставление бактериальных изолятов по определённым биологическим свойствам и ответить на вопрос о внутривидовом однообразии (разнообразии) циркулирующей популяции в структурном подразделении или медицинской организации в целом [15, 21].

Методы идентификации серотипов, используемые для оценки сопоставимости микроорганизмов, можно разделить на фенотипические (основанные на изучении антибиограмм, био-, серо- и фаготипировании, иммуноблоттинге и электрофорезе белков и др.) и генотипические (основанные на амплификации нуклеиновых кислот, секвенировании отдельных фрагментов генома и др.).

Приведённые методы существенно различаются по таким характеристикам, как воспроизводимость, разрешающая способность, стоимость, трудоёмкость проведения исследований и особенности интерпретации результатов. По основным приведённым выше характеристикам (за исключением высокой стоимости) генотипические методы обладают явными преимуществами. Для двух из генотипических методов (pulsed field gel electrophoresis — PFGE и multilocus sequence typing — MLST) разработаны стандартные протоколы, что позволяет получать в различных лабораториях полностью сопоставимые данные.

Вместе с тем большинство практикующих микробиологических лабораторий в стране не имеют возможности использовать генотипические методы для внутривидовой характеристики микроорганизмов в силу высоких финансовых затрат [22]. В связи с этим во многих медицинских организациях в качестве основного метода сопоставимости микроорганизмов по-прежнему используют метод оценки антибиограммы, что становится малоэффективным на фоне растущей резистентности к современным антимикробным препаратам [10–14, 23].

В настоящее время в общедоступной базе PubMLST.org объединены данные о типировании микробных популяций, собраны более 3900 комбинаций аллелей с типом последовательности (sequence type — ST) и более 6600 изолятов, содержащих информацию о фенотипе и происхождении *A. baumannii* [24]. Во всём мире наиболее широко распространены штаммы, продуцирующие карбапенемазу — ключевой фактор распространения бактерий с множественной лекарственной устойчивостью. В их числе ST 208 и ST 944 определены как преобладающие последовательности типа карбапенем-резистентного *A. baumannii* [25–27].

Целью исследования явилась разработка диагностической панели для внутривидового типирования *A. baumannii* часто встречаемых сиквенс-типов ST 1167, ST 944, ST 208, основанной на изучении фенотипических признаков микроорганизмов.

Материалы и методы

Видовая идентификация 74 клинических изолятов *A. baumannii* из 4 многопрофильных медицинских учреждений крупного промышленного центра Приволжского федерального округа (отделений хирургии, терапии, оториноларингологии, реанимации и сомато-психиатрии) была основана на культуральных, морфологических и тинкториальных свойствах микроорганизмов [28]. Чувствительность *A. baumannii* к профильным антибиотикам определяли в соответствии с методическими указаниями МУ 4.2.1890-04 и рекомендациями European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing [29, 30].

Мультилокусное секвенирование-типирование *A. baumannii* осуществляли с использованием наборов реагентов и оборудования фирмы «Applied Biosystems» по методике, описанной производителем [31]. Полученные в результате секвенирования нуклеотидные последовательности генов «домашнего хозяйства» обрабатывали с помощью программы «SeqMan» («DNASTAR Inc.»). Сиквенс-тип определяли, основываясь на комбинации аллелей с использованием оксфордской схемы [32]. Штаммы, находящиеся в базе данных, группировали в клональные комплексы на основании кластеризации методом eBURST для бактерий вида *A. baumannii*.

Для исследования биохимического профиля были использованы наборы «NEFERM test 24» («Erba Lachema»).

Оценку биоплёнкообразующей способности на твёрдой поверхности проводили путём культивирования изолятов *A. baumannii* в полистироловых микротитровальных 96-луночных планшетах с последующей окраской их адгезировавшей части 1% кристаллическим фиолетовым и определением оптической плотности (ОП) на спектрофотометре «Multiscan FC» («Thermo Scientific») [33, 34]. Результат определяли по критериям:

ОП $\geq 4,0$ — высокая биоплёнообразующая способность, ОП $\geq 3,0$ — умеренная, ОП $\geq 2,0$ — низкая.

Анализ наличия (отсутствия) зон задержки роста вокруг бумажных дисков с нанесёнными антибиотиками — эритромицином (15 мкг), ванкомицином (5 мкг), рифампицином (5 мкг), клиндамицином (2 мкг), фузидином (10 мкг), линезолидом (10 мкг) — проводили диско-диффузионным методом на питательном агаре Мюллера–Хинтона [29].

Чувствительность *A. baumannii* к анилиновым красителям выявляли с использованием 0,1% водно-спиртовых растворов бромтимолового синего, метилового красного, фуксина основного, бромкрезолового пурпурного. Испытуемый бактериальный штамм *A. baumannii* в виде 18-часовой бульонной культуры распределяли по поверхности чашки Петри с питательным агаром Мюллер–Хинтона. На газон с впитавшейся культурой наносили по 5 мкл 1% водно-спиртовых растворов анилиновых красителей. После впитывания капель чашки переворачивали и инкубировали при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 20–24 ч. О наличии антимикробного эффекта анилиновых красителей судили по появлению зон угнетения роста [35].

Изучение чувствительности к дезинфицирующим средствам проводили с использованием дезинфектантов «Форекс-хлор» (0,1 и 0,06%), «Амиксидин» (0,25%), «Жавель Абсолют» (0,015%), «Миродез» (2%), «Клиндезин Экстра» (0,1%) согласно Федеральным клиническим рекомендациям «Способ определения чувствительности бактерий к дезинфицирующим средствам при мониторинге устойчивости к антимикробным препаратам в медицинских организациях», а также МУ 3.5.1.3439-17 «Оценка чувствительности к дезинфицирующим средствам микроорганизмов, циркулирующих в медицинских организациях». Штаммы считали чувствительными, если гибель тестируемого микроорганизма составляла 100% (отсутствие роста во всех пробах), устойчивыми — при наличии роста хотя бы в одной пробе.

Изучение возможности использования бактериофагов в диагностических, лечебных, противоэпидемических и профилактических мероприятиях продиктовано проблемой качественного оказания медицинской помощи на фоне высокой интенсивности лечебно-диагностического процесса. Исследование чувствительности штаммов *A. baumannii* к бактериофагу проводили посредством диффузионного метода [36]. Экспериментальный образец ацинетобактерного бактериофага с высокой литической и специфической активностью был получен из биологического материала пациентов и из сточных вод медицинского учреждения. По морфологическим признакам фаг относился к морфогруппе C1 семейства *Podoviridae*. Средний уровень литической активности фага по методу Аппельмана

составил $10^{-4,62 \pm 0,18}$, концентрация фаговых частиц по Грациа — $2,8 \times 10^5$ БОЕ [37, 38]. Испытуемый бактериальный штамм в виде 18-часовой бульонной культуры распределяли по поверхности чашки Петри с питательным агаром Мюллера–Хинтона. На газон с впитавшейся культурой наносили по 1 капле (0,03 мл) бактериофага с последующей инкубацией при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 18 ч. Степень лизиса оценивали путем визуализации зоны на месте нанесения капель фага по 5-балльной шкале.

Результаты

Для внутривидовой характеристики *A. baumannii* были идентифицированы 74 полирезистентных штамма. Для секвенирования MLST отобраны в случайном порядке 15 (из 74) штаммов. Выявили 3 сиквенс-типа: ST 1167 — 6 изолятов, ST 944 — 5, ST 208 — 4.

С целью формирования диагностической панели были изучены фенотипические свойства ST 1167, ST 944, ST 208 с использованием общедоступных тестов, в том числе тесты по оценке биохимического профиля, биоплёнообразующей способности, зон задержки роста вокруг дисков с непрофильными антибиотиками, чувствительности штаммов *A. baumannii* к анилиновым красителям и дезинфицирующим средствам, а также чувствительности к бактериофагу.

На первом этапе исследования проводили оценку штаммов *A. baumannii*, отнесённых к 3 сиквенс-типам по биохимическому профилю, используя наборы «NEFERM test 24».

Все штаммы ST 1167 (100%) были положительными в тестах: цитрат Симмонса, ксилоза, арабиноза, малонат, галактоза, γ -глутамилтрансфераза (ГГТ), фосфатаза. Отрицательными — по уреазе, аргинину, орнитину, лизину, ацетамиду, β -глюкозидазе, N-ацетил β -D-глюкозидазе, лактозе, маннитулу, трегалозе, α -галактозидазе, β -галактозидазе, мальтозе, целлобиозе, сахарозе, инозитолу, эскулину. Штаммы ST 944 дали положительный результат в тестах: цитрат Симмонса, арабиноза, галактоза, фосфатаза, отрицательный — уреазе, аргинин, орнитин, лизин, ацетамид, β -глюкозидаза, N-ацетил β -D-глюкозидаза, лактоза, маннитол, трегалоза, ксилоза, α -галактозидаза, β -галактозидаза, малонат, мальтоза, целлобиоза, сахароза, инозитол, ГГТ, эскулин.

Изоляты ST 208 были положительными по цитрату Симмонса, ксилозе, арабинозе, галактозе, фосфатазе, отрицательными — по уреазе, аргинину, орнитину, лизину, ацетамиду, β -глюкозидазе, N-ацетил- β -D-глюкозидазе, лактозе, маннитулу, трегалозе, α -галактозидазе, β -галактозидазе, малонату, мальтозе, целлобиозе, сахарозе, инозитолу, ГГТ, эскулину.

Штаммы *A. baumannii* ST 1167 отличались от ST 944 и ST 208 по малонату и ГГТ, а ST 944 от других

сиквенс-типов — по ксилозе. Наибольшая биохимическая активность выявлена у представителей ST 1167 (были положительными в 7 тестах из 24), наименьшей биохимической активностью характеризовались ST 944 (положительны лишь в 4 из 24 тестов).

Таким образом, по результатам оценки биохимического профиля исследуемых сиквенс-типов (ST 1167, ST 944, ST 208) для проведения типирования были отобраны тесты: малонат, ГГТ, ксилоза.

По результатам тестирования установлено, что высокую биоплёнкообразующую активность имели штаммы ST 944 (ОП = 4,03–5,12), умеренную — ST 1167 (ОП = 2,03–3,05). Низкой плёнкообразующей способностью обладали изоляты *A. baumannii* ST 208 (ОП = 1,07–1,82).

В качестве эксперимента по определению зон задержки роста *A. baumannii* вокруг дисков с антибиотиками были использованы препараты, которые для лечения инфекционной патологии с участием *A. baumannii* не применяются: эритромицин (15 мкг), ванкомицин (5 мкг), рифампицин (5 мкг), клиндамицин (2 мкг), фузидин (10 мкг), линезолид (10 мкг). Оценку результатов проводили по признаку наличия (отсутствия) задержки зоны роста бактериальной культуры, выросшей на питательном агаре Мюллера–Хинтона, вокруг диска с испытуемым антибиотиком. Анализ зон задержки роста вокруг дисков с антибактериальными препаратами установил, что все штаммы, отнесенные к ST 1167, имели зону задержки роста к эритромицину, ванкомицину, рифампицину, клиндамицину и линезолиду. Исключение составил фузидин — 2 штамма из 6 дали рост вокруг диска сплошным газонем. Штаммы ST 944 имели зоны задержки роста к единственному антибиотику — рифампицину. Рост изолятов ST 208 подавляли только ванкомицин и рифампицин. Как показали результаты исследования, для внутривидового типирования 3 сиквенс-типов *A. baumannii* можно использовать диски с 4 антибиотиками: эритромицином, ванкомицином, клиндамицином и линезолидом.

Оценка чувствительности изучаемых изолятов к анилиновым красителям (бромтимоловый синий, метиловый красный, фуксин основной, бромкрезоловый пурпурный) установила, что рост штаммов ST 1167 подавлял фуксин основной, в остальных тестах представители данного сиквенс-типа оказались невосприимчивыми к красителям. У штаммов ST 944 выявлена различная степень чувствительности к бромтимоловому синему и фуксину основному, зоны задержки роста к остальным 2 красителям не были обнаружены. Штаммы ST 208 были устойчивы ко всем тестируемым анилиновым красителям.

Исходя из представленных выше результатов, данный признак не может быть применен для типирования в силу его высокой варибельности, в том числе внутри групп.

Анализ чувствительности выделенных изолятов *A. baumannii* к дезинфицирующим средствам установил, что все тестируемые штаммы были устойчивы к 0,06% раствору «Форекс-хлор». Остальные дезинфицирующие средства характеризовались значительной варибельностью, что позволило сделать вывод о нецелесообразности их использования для внутривидового типирования ST 1167, ST 944, ST 208.

Изучение чувствительности к ацинетобактерному бактериофагу проведено диффузионным методом (спот-тест) на питательной среде Мюллера–Хинтона. Исследование фаголизательности к бактериофагу показало, что штаммы *A. baumannii* ST 1167 имели высокий уровень чувствительности (5 изолятов получили оценку «++++»). Клинический изолят № 680 из этой группы отличался наличием единичных колоний вторичного роста в зоне лизиса, поэтому результат был оценен на «+++», что также относится к оценке результата как высокого. Штаммы сиквенс-типов (ST 944, ST 208) проявили устойчивость к ацинетобактерному бактериофагу (оценка «—»).

Основываясь на указанных выше данных, ацинетобактерный бактериофаг может быть применён для внутривидового типирования *A. baumannii*.

Таким образом, определён набор дифференцирующих тестов, позволяющих выявить внутривидовые особенности полирезистентных штаммов *A. baumannii* 3 сиквенс-типов (ST 1167, ST 944 и ST 208) по способности к разложению ксилозы, малоната натрия, ГГТ; наличию зон задержки роста к эритромицину, клиндамицину, линезолиду, ванкомицину; выраженности теста на плёнкообразующую способность; чувствительности к ацинетобактерному бактериофагу (таблица).

Разработанная диагностическая панель позволила осуществить внутривидовую дифференциацию оставшихся 59 из 74 штаммов *A. baumannii*. По результатам тестирования из 59 штаммов *A. baumannii* 28 были отнесены к ST 1167, 14 — к ST 944, 15 — к ST 208. Оставшиеся 2 штамма по основным признакам, входящим в панель тестирования, не подходили ни к одной из представленных групп. В дальнейшем их генетическая принадлежность была подтверждена методом MLST. Штамм *A. baumannii* № 80 был отнесен к ST 502, штамм № 76 — к ST 450.

Обсуждение

В ходе исследования штаммов *A. baumannii* 3 сиквенс-типов (ST 1167, ST 944, ST 208) сформирован оптимальный набор дифференциальных тестов, позволяющих выявить внутривидовые особенности микроорганизмов по фенотипическим признакам (отношение к ксилозе, малонату, ГГТ (биохимическим тестам), биоплёнкообразующей способности,

Ключевые признаки штаммов *A. baumannii* сиквенс-типов 1167, 944, 208 для внутривидовой характеристики
Key features of *A. baumannii* sequence type strains 1167, 944, and 208 for intraspecific typing

Показатель Parameter		ST 1167	ST 944	ST 208
Биохимические свойства Biochemical tests	ксилоза xylose	+	-	+
	малонат malonate	+	-	-
	ГГТ γ-glutamyltransferase	+	-	-
Пленкообразующая способность Biofilmogenous capacity		Умеренная Moderate	Высокая High	Низкая Low
Наличие зон задержки роста к непрофильным антибиотикам Growth inhibition zones to antibacterial drugs	эритромицин erythromycin	+	-	-
	клиндамицин clindamycin	+	-	-
	линезолид linezolid	+	-	-
	ванкомицин vancomycin	+	-	+
Чувствительность к бактериофагу Sensitivity to bacteriophage		+	-	-

резистентности к эритромицину, клиндамицину, линезолиду (по зонам задержки роста), чувствительности к ацинетобактерному бактериофагу.

Производство и реализация тест-системы для определения внутривидовой принадлежности штаммов *A. baumannii* станет эффективным и экономичным методом внутривидового типирования микроорганизмов для научных и практических целей. Затраты на проведение тестирования составят 205,5–240,8 руб., длительность проведения исследования — 24 ч. С учётом стоимости сиквенс-типирования (3000 руб.) экономия составит более 2700 руб., снижение цены произойдёт в 14,6–12,4 раза. Метод станет доступен любой бактериологической лаборатории, осуществляющей диагностику инфекционно-воспалительных заболеваний человека и животных.

По результатам проведённых нами исследований в международную базу данных PubMLST депонированы 6 сиквенс-типов (ST) *A. baumannii*, выделенных из медицинских организаций (№ 942 (22F); № 943 (32F); № 944 (23F); № 945 (28F); № 946 (2179F) и № 952 (31) [24].

Заключение

В рамках микробиологического мониторинга в системе эпидемиологического надзора за ИСМП разработанная диагностическая панель позволит проводить внутривидовую дифференциацию 3 широко распространённых сиквенс-типов *A. baumannii*, характеризующихся высоким уровнем циркуляции и устойчивостью к антимикробным препаратам. Прежде всего, тест-система будет актуальна и востребована для лабораторий и науч-

ных подразделений, не имеющих возможности использовать методы секвенирования.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Захарова Ю.А., Фельдблюм И.В. Стандартное эпидемиологическое определение внутрибольничного штамма (эковара) лечебно-профилактического учреждения. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2008; (6): 19–23.
- Коза Н.М. Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи. Эпидемиология и профилактика (обзорная лекция). *Пермский медицинский журнал*. 2013; 30(4): 135–43.
- Онищенко Г.Г. Заболеваемость внутрибольничными инфекциями в Российской Федерации. *Гигиена и санитария*. 2008; 87(3): 1–6.
- Покровский В.И., Акимкин В.Г., Брико Н.И., Брусина Е.Б., Захарова Ю.А., Зуева Л.П. и др. Пути совершенствования лабораторной диагностики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. *Медицинский альманах*. 2012; (2): 12–6.
- Потехина Н.Н., Рахманов Р.С., Пискарев Ю.Г., Гришин Д.Б., Орлов Е.В. Организация эпидемиологического надзора за антибиотикорезистентностью возбудителей гнойно-септической инфекции в условиях поликлиники. *Здоровье населения и среда обитания*. 2014; (11): 49–50.
- Labarca J.A., Salles M.J., Seas C., Guzmán-Blanco M. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. *Crit. Rev. Microbiol.* 2016; 42(2): 276–92. <https://doi.org/10.3109/1040841x.2014.940494>
- MacVane S.H. Antimicrobial resistance in the intensive care unit: a focus on gram-negative bacterial infections. *J. Intensive Care Med.* 2017; 32(1): 25–37. <https://doi.org/10.1177/0885066615619895>
- Spellberg B., Rex J.H. The value of single-pathogen antibacterial agents. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2013; 12(12): 963. <https://doi.org/10.1038/nrd3957-c1>
- Sievert D.M., Ricks P., Edwards J.R., Schneider A., Patel J., Srinivasan A., et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported

- to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 2013; 34(1): 1–14. <https://doi.org/10.1086/668770>
10. Козлова Н.С., Баранцевич Н.Е., Баранцевич Е.П. Антибиотикорезистентность возбудителей гнойно-септических инфекций в многопрофильном стационаре. *Проблемы медицинской микологии.* 2018; 20(1): 40–8.
11. Скурихина Ю.Е., Туркутоков В.Б. Микробиологические и молекулярно-генетические аспекты антибиотикорезистентности *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2019; 18(6): 34–8. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-6-34-38>
12. Тапальский Д.В., Бонда Н.А. *Acinetobacter baumannii*: распространенность, спектр и динамика антибиотикорезистентности, чувствительность к комбинациям антибиотиков. *Журнал Гродненского государственного медицинского университета.* 2018; 16(3): 286–91. <https://doi.org/10.25298/2221-8785-2018-16-3-286-291>
13. Potron A., Poirel L., Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2015; 45(6): 568–85. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.03.001>
14. Ulu-Kilic A., Gundogdu A., Cevahir F., Kilic H., Gunes T., Alp E. An outbreak of bloodstream infection due to extensively resistant *Acinetobacter baumannii* among neonates. *Am. J. Infect. Control.* 2018; 46(2): 154–8. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2017.08.007>
15. Dijkshoorn L., Nemeč A., Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2007; 5(12): 939–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1789>
16. Горбич Ю.Л., Карпов И.А., Кречикова О.И. Инфекции, вызванные *Acinetobacter baumannii*: факторы риска, диагностика, лечение, подходы к профилактике. *Медицинские новости.* 2011; (5): 31–9.
17. Peleg A.Y., Seifert H., Paterson D.L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 2008; 21(3): 538–82. <https://doi.org/10.1128/cmr.00058-07>
18. Тапальский Д.В. *Экстремально-антибиотикорезистентные грамотрицательные бактерии: распространение и стратегии антимикробного воздействия.* Минск; 2019.
19. Cerceo E., Deitzelzweig S.B., Sherman B.M., Amin A.N. Multidrug-resistant gram-negative bacterial infections in the hospital setting: overview, implications for clinical practice, and emerging treatment options. *Microb. Drug Resist.* 2016; 22(5): 412–31. <https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0220>
20. Lim C.L.L., Chua A.Q., Teo J.Q.M., Cai Y., Lee W., Kwa A.L. Importance of control groups when delineating antibiotic use as a risk factor for carbapenem resistance, extreme-drug resistance, and pan-drug resistance in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Infect. Dis.* 2018; 76: 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.05.017>
21. Фельдблюм И.В., Захарова Ю.А., Николаева А.М., Федотова О.С. Эпидемиологическая диагностика внутрибольничных гнойно-септических инфекций синегнойной этиологии на основе внутривидового типирования возбудителя. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2013; (1): 14–20.
22. Воронина О.Л., Рыжова О.Л., Кунда О.Л., Лазарева А.В., Аксенова Е.И., Буркина Н.И. и др. Современные методы лабораторной диагностики в эпидемиологическом мониторинге возбудителей внутрибольничных инфекций. *Политика.* 2016; (4-1): 22–5.
23. Захарова Ю.А., Федотова О.С., Николаева А.М., Климашина А.В. Изучение чувствительности штаммов *Acinetobacter baumannii*, циркулирующих в медицинских организациях г. Перми, к антибиотикам и экспериментальной серии бактериофага. *Дезинфекционное дело.* 2016; (1): 23–8.
24. Jolley K.A., Bray J.E., Maiden M.C.J. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res.* 2018; 3: 124. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>
25. Karah N., Sundsfjord A., Towner K., Samuelsen Ø. Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. *Drug Resist. Updat.* 2012; 15(4): 237–47. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2012.06.001>
26. Wang X., Du Z., Huang W., Zhang X., Zhou Y. Outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ST208 producing OXA-23-like carbapenemase in a children's hospital in Shanghai, China. *Microb. Drug. Resist.* 2021; 27(6): 816–22. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0232>
27. Fonseca E.L., Caldart R.V., Freitas F.S., Morgado S.M., Rocha L.T., Dos Santos R.C., et al. Emergence of extensively drug-resistant international clone IC-6 *Acinetobacter baumannii* carrying blaOXA-72 and blaCTX-M-115 in the Brazilian Amazon region. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2020; 20: 18–21. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.06.014>
28. Хоулт Дж. *Определитель бактерий Берджи.* М.: Мир; 1997.
29. МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. М.; 2004.
30. Giske C.G., Martinez L., Canton R., Stefani S., Skov R., Glupczynski Y., et al. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST; 2017.
31. Платонов А.Е., Шипулин Г.А., Платонова О.В. Мультилокусное секвенирование-новый метод генотипирования бактерий и первые результаты его применения. *Генетика.* 2000; 36(5): 597–605.
32. Bartual S.G., Seifert H., Hippler C., Luzon M.A., Wisplinghoff H., Rodríguez-Valera F. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(9): 4382–90. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.9.4382-4390.2005>
33. Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J., Baddour L.M., Barrett F.F., Melton D.M., et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *Staphylococci* to medical devices. *J. Clin. Microbiol.* 1985; 22(6): 996–1006. <https://doi.org/10.1128/jcm.22.6.996-1006.1985>
34. O'Toole G., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 2000; 54: 49–79. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49>
35. Маслов Ю.Н., Фельдблюм И.В., Перушина О.Г., Прохорова Л.А., Ахмадзянова А.Р., Алиева Э.Х. Показатель чувствительности бактериальных культур к анилиновым красителям как эпидемиологический маркер. *Медицинский алфавит.* 2015; 1(6): 23–6.
36. Адамс М. *Бактериофаги. Методы изучения вирусов бактерий.* Пер. с англ. М.; 1961.
37. Федотова О.С., Захарова Ю.А. Микробиологические аспекты получения препарата бактериофага против *Acinetobacter baumannii*. *Медицинский альманах.* 2018; (1): 126–9.
38. Захарова Ю.А., Николаева А.М., Красильникова А.Н., Попова Н.Р., Федотова О.С. Изучение специфической активности и безопасности лечебно-профилактического препарата бактериофага против *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*. *Медицинский алфавит.* 2016; 1(6): 42–6.

REFERENCES

1. Zakharova Yu.A., Fel'dblyum I.V. Standard epidemiological determination on a nosocomial strain (ecovar) at a therapeutic

- tic-and-prophylactic institution. *Epidemiologiya i infeksionnyye bolezni*. 2008; (6): 19–23. (in Russian)
2. Koza N.M. Infections connected with rendering medical care. Epidemiology and prevention (review lecture). *Permskiy meditsinskiy zhurnal*. 2013; 30(4). (in Russian)
 3. Onishchenko G.G. Incidence of nosocomial infections in the Russian Federation. *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2008; (3): 1–6. (in Russian)
 4. Pokrovskiy V.I., Akimkin V.G., Briko N.I., Brusina E.B., Zakharova Yu.A., Zueva L.P., et al. The ways of the improvement of laboratory diagnostics of infections, connected with medical help. *Meditsinskiy al'manakh*. 2012; (2): 12–6. (in Russian)
 5. Potekhina N.N., Rakhmanov R.S., Piskarev Yu.G., Grishin D.B., Orlov E.V. Organization of epidemiological surveillance on antibiotic resistance of causative agents of pyoseptic infection at outpatients' clinic settings. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya*. 2014; (11): 49–50. (in Russian)
 6. Labarca J.A., Salles M.J., Seas C., Guzmán-Blanco M. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. *Crit. Rev. Microbiol.* 2016; 42(2): 276–92. <https://doi.org/10.3109/1040841x.2014.940494>
 7. MacVane S.H. Antimicrobial resistance in the intensive care unit: a focus on gram-negative bacterial infections. *J. Intensive Care Med.* 2017; 32(1): 25–37. <https://doi.org/10.1177/0885066615619895>
 8. Spellberg B., Rex J.H. The value of single-pathogen antibacterial agents. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2013; 12(12): 963. <https://doi.org/10.1038/nrd3957-c1>
 9. Sievert D.M., Ricks P., Edwards J.R., Schneider A., Patel J., Srinivasan A., et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 2013; 34(1): 1–14. <https://doi.org/10.1086/668770>
 10. Kozlova N.S., Barantsevich N.E., Barantsevich E.P. Antibiotic-resistance in agents of nosocomial infections in a multidisciplinary medical centre. *Problemy meditsinskoy mikologii*. 2018; 20(1): 40–8. (in Russian)
 11. Skurikhina Yu.E., Turkyukov V.B. Microbiological and molecular genetic aspects of antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika*. 2019; 18(6): 34–8. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-6-34-38> (in Russian)
 12. Tapal'skiy D.V., Bonda N.A. *Acinetobacter baumannii*: prevalence, spectrum and dynamics of antimicrobial resistance, susceptibility to antibiotic combinations. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2018; 16(3): 286–91. <https://doi.org/10.25298/2221-8785-2018-16-3-286-291> (in Russian)
 13. Potron A., Poirel L., Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2015; 45(6): 568–85. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.03.001>
 14. Ulu-Kilic A., Gundogdu A., Cevahir F., Kilic H., Gunes T., Alp E. An outbreak of bloodstream infection due to extensively resistant *Acinetobacter baumannii* among neonates. *Am. J. Infect. Control.* 2018; 46(2): 154–8. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2017.08.007>
 15. Dijkshoorn L., Nemeč A., Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2007; 5(12): 939–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1789>
 16. Gorbich Yu.L., Karpov I.A., Krechikova O.I. Infections caused by *Acinetobacter baumannii*: risk factors, diagnosis, treatment, approaches to prevention. *Meditsinskie novosti*. 2011; (5): 31–9. (in Russian)
 17. Peleg A.Y., Seifert H., Paterson D.L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 2008; 21(3): 538–82. <https://doi.org/10.1128/cmr.00058-07>
 18. Tapal'skiy D.V. *Extremely antibiotic-resistant gram-negative bacteria: distribution and strategies of antimicrobial action [Ekstremal'no-antibiotikorezistentnye gramotritsatel'nye bakterii: rasprostraneniye i strategii antimikrobnogo vozdeystviya]*. Minsk; 2019. (in Russian)
 19. Cerceo E., Deitelzweig S.B., Sherman B.M., Amin A.N. Multidrug-resistant gram-negative bacterial infections in the hospital setting: overview, implications for clinical practice, and emerging treatment options. *Microb. Drug Resist.* 2016; 22(5): 412–31. <https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0220>
 20. Lim C.L.L., Chua A.Q., Teo J.Q.M., Cai Y., Lee W., Kwa A.L. Importance of control groups when delineating antibiotic use as a risk factor for carbapenem resistance, extreme-drug resistance, and pan-drug resistance in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Infect. Dis.* 2018; 76: 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.05.017>
 21. Fel'dblyum I.V., Zakharova Yu.A., Nikolaeva A.M., Fedotova O.S. Epidemiologic diagnostic of nosocomial suppurative-septic infections of *Pseudomonas* etiology based on intraspecies typing of causative agent. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2013; (1): 14–20. (in Russian)
 22. Voronina O.L., Ryzhova O.L., Kunda O.L., Lazareva A.V., Aksenova E.I., Burkina N.I., et al. Actual methods of laboratory diagnostics in epidemiological monitoring of nosocomial infection. *Poliklinika*. 2016; (4-1): 22–5. (in Russian)
 23. Zakharova Yu.A., Fedotova O.S., Nikolaeva A.M., Klimashina A.V. Study of sensitive strains *Acinetobacter baumannii* from medical organizations of perm to antibiotics and experimental series of bacteriophages. *Dezinfektsionnoe delo*. 2016; (1): 23–8. (in Russian)
 24. Jolley K.A., Bray J.E., Maiden M.C.J. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res.* 2018; 3: 124. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>
 25. Karah N., Sundsfjord A., Towner K., Samuelsen Ø. Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. *Drug Resist. Updat.* 2012; 15(4): 237–47. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2012.06.001>
 26. Wang X., Du Z., Huang W., Zhang X., Zhou Y. Outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ST208 producing OXA-23-like carbapenemase in a children's hospital in Shanghai, China. *Microb. Drug. Resist.* 2021; 27(6): 816–22. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0232>
 27. Fonseca É.L., Caldart R.V., Freitas F.S., Morgado S.M., Rocha L.T., Dos Santos R.C., et al. Emergence of extensively drug-resistant international clone IC-6 *Acinetobacter baumannii* carrying blaOXA-72 and blaCTX-M-115 in the Brazilian Amazon region. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2020; 20: 18–21. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.06.014>
 28. Holt J.G. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1994.
 29. Methodological guidelines 4.2.1890-04. Determination of the sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs. Moscow; 2004. (in Russian)
 30. Giske C.G., Martinez L., Canton R., Stefani S., Skov R., Glupczynski Y., et al. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST; 2017.
 31. Platonov A.E., Shipulin G.A., Platonova O.V. Multilocus sequence typing: a new method and the first results in the genotyping of bacteria. *Genetika*. 2000; 36(5): 481–7.
 32. Bartual S.G., Seifert H., Hippler C., Luzon M.A., Wisplinghoff H., Rodríguez-Valera F. Development of a multilocus se-

- quence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(9): 4382–90.
<https://doi.org/10.1128/jcm.43.9.4382-4390.2005>
33. Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J., Baddour L.M., Barrett F.F., Melton D.M., et al. Adherence of coagulase-negative *Staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *Staphylococci* to medical devices. *J. Clin. Microbiol.* 1985; 22(6): 996–1006.
<https://doi.org/10.1128/jcm.22.6.996-1006.1985>
34. O'Toole G., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 2000; 54: 49–79.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49>
35. Maslov Yu.N., Fel'dblyum I.V., Pegushina O.G., Prokhorova L.A., Akhmadzhanova A.R., Alieva E.Kh. Indicator of bacterial cultures' sensitivity to aniline stains as epidemiological marker. *Meditsinskiy alfavit.* 2015; 1(6): 23–6. (in Russian)
36. Adams M.H. *Bacteriophages*. New York-London: Interscience publ.; 1959.
37. Fedotova O.S., Zakharova Yu.A. Microbiological aspects of bacteriophage preparation vs. *Acinetobacter baumannii*. *Meditsinskiy al'manakh.* 2018; 52(1): 126–9. (in Russian)
38. Zakharova Yu.A., Nikolaeva A.M., Krasil'nikova A.N., Popova N.R., Fedotova O.S. Studies of specific activity and safety of medical-prophylactic bacteriophage preparation against *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Meditsinskiy alfavit.* 2016; 1(6): 42–6. (in Russian)

Информация об авторах

Федотова Ольга Семеновна — с.н.с., зав. лаб. клеточных культур ЕНИИВИ ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Екатеринбург, Россия,
<https://orcid.org/0000-0003-1928-8211>

Захарова Юлия Александровна[✉] — д.м.н., доц., зам. рук. по научной работе, г.н.с. ЕНИИВИ ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Екатеринбург, Россия, zakharova_ya@eniivi.ru,
<https://orcid.org/0000-0003-3416-0902>

Остапчук Анна Владимировна — магистр УрФУ им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, ЕНИИВИ ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Екатеринбург, Россия,
<https://orcid.org/0000-0002-8157-6866>

Бажанова Ульяна Александровна — зав. арбитражной лаб. ЕНИИВИ ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Екатеринбург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1730-0013>

Захаров Александр Андреевич — магистр РХТУ им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия,
<https://orcid.org/0000-0002-8573-0939>

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 25.08.2021;
принята к публикации 28.10.2021;
опубликована 25.12.2021

Information about the authors

Olga S. Fedotova — senior researcher, Head, Cell culture laboratory, Ekaterinburg Research Institute of Viral Infections, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Yekaterinburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1928-8211>

Yulia A. Zakharova[✉] — D. Sci. (Med.), Associate Professor, Deputy director for academic affairs, chief researcher, Ekaterinburg Research Institute of Viral Infections, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Yekaterinburg, Russia, zakharova_ya@eniivi.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3416-0902>

Anna V. Ostapchuk — Master of science, Ural Federal State University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin, Ekaterinburg Research Institute of Viral Infections, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Yekaterinburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8157-6866>

Uliana A. Bazhanova — Head, Reference laboratory, Ekaterinburg Research Institute of Viral Infections, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Yekaterinburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1730-0013>

Alexandr A. Zakharov — Master of science, D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8573-0939>

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 25.08.2021;
accepted for publication 28.10.2021;
published 25.12.2021

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-183>

Формирование специфического иммунитета у лабораторных животных после одновременной вакцинации против сезонного гриппа и COVID-19

Игнатъев Г.М.¹, Ленева И.А.², Отрашевская Е.В.³, Козловская Л.И.¹,
Карташова Н.П.², Федякина И.Т.², Шустова Е.Ю.¹, Синюгина А.А.¹,
Зверев В.В.⁴, Трухин В.П.³, Ишмухаметов А.А.¹

¹Федеральный научный центр исследования и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия;

²НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия;

³Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

⁴Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Аннотация

Введение. Клиническая дифференциальная диагностика COVID-19 может быть затруднительна в случае совпадения с сезоном гриппа, что, в свою очередь, может приводить к несвоевременности принятия необходимых мер для борьбы с пандемией SARS-CoV-2. Существует также проблема сопутствующего SARS-CoV-2 инфицирования вирусом гриппа (ВГ), что значительно утяжеляет течение COVID-19.

Целью настоящей работы было изучение взаимного влияния одновременной иммунизации отечественными вакцинами для профилактики гриппа и COVID-19 на формирование специфического иммунитета лабораторных животных.

Материалы и методы. В исследовании использовали мышей линии BALB/c. Иммунизацию животных проводили внутримышечно вакциной для профилактики COVID-19 (КовиВак) и вакциной для профилактики гриппа (Флю-М). Сыворотки иммунизированных животных исследовали индивидуально. Реакцию торможения гемагглютинации проводили с тремя штаммами ВГ. Антитела (АТ) к SARS-CoV-2 определяли при помощи иммуноферментного анализа. Для выявления вируснейтрализующих АТ к SARS-CoV-2 и к ВГ проводили реакцию нейтрализации.

Результаты. Обнаружены достаточно высокие титры специфических АТ в группах животных, привитых как одной, так и двумя вакцинами одновременно. В группах животных, привитых КовиВак и двумя вакцинами одновременно, как в иммуноферментном анализе, так и в реакции нейтрализации средние показатели специфических АТ к SARS-CoV-2 статистически не различались. В группе животных, привитых одновременно двумя вакцинами, обнаружены статистически более высокие титры АТ к ВГ после второй иммунизации относительно группы животных, привитых Флю-М.

Обсуждение. Продемонстрировано формирование поствакцинального иммунитета как к ВГ, так и к SARS-CoV-2 после одновременной иммунизации двумя вакцинами. Обнаруженное усиление поствакцинального иммунного ответа к ВГ у лабораторных животных, привитых двумя вакцинами одновременно, требует дальнейшего изучения.

Заключение. Проведённые исследования позволяют предположить возможность одновременной вакцинации для профилактики гриппа и COVID-19.

Ключевые слова: грипп, SARS-CoV-2, одновременная вакцинация

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010).

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

Конфликт интересов. Вакцина КовиВак предоставлена организацией-разработчиком, занимающейся её распространением. В число авторов статьи входят сотрудники и генеральный директор данной организации. Вакцина Флю-М предоставлена организацией-разработчиком, занимающейся её распространением. В число авторов статьи входят сотрудники и директор данной организации.

Для цитирования: Игнатъев Г.М., Ленева И.А., Отрашевская Е.В., Козловская Л.И., Карташова Н.П., Федякина И.Т., Шустова Е.Ю., Синюгина А.А., Зверев В.В., Трухин В.П., Ишмухаметов А.А. Формирование специфического иммунитета у лабораторных животных после одновременной вакцинации против сезонного гриппа и COVID-19. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(6):648–656.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-183>

Development of specific immunity in laboratory animals after co-immunization against seasonal influenza and COVID-19

Georgy M. Ignatyev^{1✉}, Irina A. Leneva², Alena V. Atrasheuskaya³, Liubov I. Kozlovskaya¹, Nadezhda P. Kartashova², Irina T. Fediakina², Elena Yu. Shustova¹, Aleksandra A. Sinyugina¹, Vitaly V. Zverev⁴, Victor P. Trukhin³, Aidar A. Ishmukhametov¹

¹Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

²I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia;

³Saint-Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Serums, Saint Petersburg, Russia;

⁴I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Abstract

Introduction. In clinical practice, the differential diagnosis of COVID-19 can be challenging during the flu season, entailing serious consequences such as delays in appropriate control measures against the SARS-CoV-2 pandemic. Another problem is posed by co-infection of SARS-CoV-2 and influenza virus (IV), which significantly contributes to the severity of the COVID-19 disease.

This study was aimed to explore the cross-impact of co-administration of Russian influenza and COVID-19 vaccines on development of specific immunity in laboratory animals.

Materials and methods. The study was conducted on BALB/c mice. The animals were inoculated intramuscularly with the vaccine for COVID-19 prevention (CoviVac) and the vaccine for influenza prevention (Flu-M). The sera from the immunized animals were examined separately. Three IV strains were used in the hemagglutination inhibition assay. Antibodies (Abs) against SARS-CoV-2 were detected by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The neutralization test was performed to detect virus neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 and IV.

Results. Relatively high titers of specific Abs were found in the groups of animals inoculated with one vaccine and with two vaccines concurrently. In the groups of animals inoculated with CoviVac and with two vaccines concurrently, both in the ELISA test and in the neutralization test, the average titers of specific Abs against SARS-CoV-2 did not demonstrate any statistical difference. The group of animals inoculated concurrently with two vaccines demonstrated statistically higher titers of Abs against IV after the second immunization compared to the group of animals inoculated with Flu-M.

Discussion. The study has shown that post-vaccination immunity both to IV and to SARS-CoV-2 develops after co-vaccination with two vaccines. The observed enhanced post-vaccination immune response to IV in the co-immunized laboratory animals needs further research.

Conclusion. The performed studies suggest the possibility of co-administration of two vaccines to prevent influenza and COVID-19.

Keywords: *influenza, SARS-CoV-2, co-vaccination*

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010).

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

Conflict of interest. The CoviVac vaccine was provided by the development and distribution organization. The authors of the article include employees and the general director of this organization. The Flu-M vaccine was provided by the development and distribution organization. The authors of the article include employees and the director of the organization.

For citation: Ignatyev G.M., Leneva I.V., Atrasheuskaya A.V., Kozlovskaya L.I., Kartashova N.P., Fediakina I.T., Shustova E.Yu., Sinyugina A.A., Zverev V.V., Trukhin V.P., Ishmukhametov A.A. Development of specific immunity in laboratory animals after co-immunization against seasonal influenza and COVID-19. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(6):648–656. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-183>

Введение

Грипп и COVID-19 представляют собой респираторные вирусные заболевания, которые могут быть клинически неотличимы и, как правило, опасны для жизни в основном одних и тех же групп населения — пожилых людей и людей, страдающих хроническими заболеваниями. Симпто-

мы COVID-19 в большинстве случаев протекают легко и напоминают простуду. Поскольку и грипп, и COVID-19 — респираторные вирусные заболевания, их пик активности может приходиться на один и тот же период года — зимние месяцы в странах с умеренным климатом. В случае совпадения с сезоном гриппа клиническая дифференциальная ди-

агностика гриппа и COVID-19 может быть затруднительна, что, в свою очередь, может приводить к несвоевременности принятия необходимых мер для борьбы с пандемией SARS-CoV-2 [1].

Во время продолжающейся или рецидивирующей циркуляции SARS-CoV-2 одновременно с вирусом гриппа (ВГ) в осенне-зимний сезон вакцинация против гриппа может снизить как распространённость самого гриппа, так и количество случаев с симптомами, которые можно спутать с симптомами COVID-19. Предотвращение и снижение тяжести симптомов гриппа, уменьшение количества амбулаторных гриппоподобных заболеваний в целом, количества госпитализаций и реанимационных мероприятий за счёт вакцинации против гриппа также может снизить нагрузку на систему здравоохранения [1, 2]. Следует также отметить, что диагностические тесты, а также человеческие ресурсы ограничены. Неполная и несвоевременная диагностика, в том числе дифференциальная, будет значительно воздействовать на работу системы здравоохранения в плане принятия адекватных противоэпидемических мер и создавать напряжённость в работе лечебных учреждений, а также повышать вероятность внутрибольничной передачи инфекции.

Исходя из приведённых выше соображений, большинство медицинских работников выступают за расширение программ вакцинации против гриппа, т.к. увеличение охвата населения вакцинацией против сезонного гриппа может помочь организации диагностических и лечебных мероприятий в период продолжающейся пандемии SARS-CoV-2, позволив упростить дифференциальную диагностику, а также снизить нагрузку как на систему здравоохранения в целом, так и на отделения интенсивной терапии в частности [1, 3]. Так, например, в 2002 г. во время вспышки «тяжёлого острого респираторного синдрома», вызванного SARS-CoV-1, Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) рекомендовала активизировать кампанию по вакцинации против гриппа, ориентированную на группы риска, чтобы иметь возможность быстро дифференцировать эти инфекции и принимать более точные и эффективные меры противодействия [4]. Руководство Центра по контролю и профилактике заболеваний США в период пандемии SARS-CoV-2 настоятельно рекомендует медицинским работникам использовать любую возможность для проведения вакцинации против гриппа до начала сезона [5].

Однако некоторое время в научном сообществе и в средствах массовой информации велись дискуссии по поводу взаимосвязи между вакцинацией против гриппа и COVID-19. Исследование, проведённое G.G. Wolff, «выявило» повышенный риск заболевания коронавирусом у лиц, вакцинированных против гриппа [6]. Он предположил, что вакцинация против гриппа снижает вероятность зараже-

ния гриппом, но при этом отсутствует стимуляция ВГ врождённого иммунитета, что и повышает, в итоге, риск заболевания COVID-19. Исследования G.G. Wolff, и в особенности его неожиданные выводы, привели не только к активному обсуждению, но и к исследованию данного «феномена». Ретроспективный статистический анализ взаимосвязи между вакцинацией против гриппа и другими респираторными, в том числе коронавирусными, заболеваниями сезонов 2010–2011 гг. и 2016–2017 гг. в Канаде [7], а также сезона COVID 2019/2020 в Италии [8] опровергли выводы, сделанные G.G. Wolff. Также было продемонстрировано отсутствие связи между вакцинацией против гриппа и COVID-19 в исследовании, в котором изучались связи между вакцинацией против гриппа и заболеваемостью SARS-CoV-2 у медицинских работников [5]. Более того, M.D. Ricció и соавт., проведя системный анализ опубликованных данных, обнаружили обратную зависимость, которая была несколько неожиданной, учитывая, что гриппозные вакцины не предназначены для защиты от SARS-CoV-2 [3].

Китайскими и канадскими учёными путём математического моделирования была протестирована гипотеза о том, что кампания массовой вакцинации против гриппа будет иметь положительное влияние на организацию медицинской помощи и результаты лечения пациентов с неспецифическими симптомами и гриппоподобными жалобами с риском развития COVID-19 или других респираторных инфекций. Результаты показали, что увеличение уровня охвата вакцинацией против гриппа до оптимального порога задолго до начала сезона будет способствовать усилиям по сдерживанию вспышки COVID-19 в плане быстрой постановки диагноза и принятия адекватных противоэпидемических мер [1].

Многие авторы сходятся во мнении, что исследования зависимости заболеваемости COVID-19 от вакцинации против сезонного гриппа следует продолжать, чтобы подтвердить предварительные выводы и изучить их валидность в отношении различных групп населения [3, 5, 8].

Существует ещё одна проблема, которая также требует исследования оценки влияния вакцинации против гриппа в период не только пандемии COVID-19, но и в последующие периоды. Проведённый китайскими учёными метаанализ опубликованных данных показал, что распространённость коинфекции у пациентов с COVID-19 варьировала в разных исследованиях, однако могла достигать 50% среди летальных случаев. Сопутствующие патогены включали как бактерии, так и вирусы. Вирус гриппа А был одним из наиболее распространённых среди вирусов, которые сопутствовали коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 [9, 10]. Проведённые экспериментальные работы по одновременному заражению хорьков ВГ, штамм А1N1, и вирусом

SARS-CoV-2 продемонстрировали значительное утяжеление инфекционного процесса и увеличение смертности [11].

Также было обнаружено, что сопутствующее инфицирование ВГ также может приводить к ложноотрицательному результату на rRT-PCR, особенно при тяжёлой форме острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 [9]. Диагностирование инфекции SARS-CoV-2 важно, поскольку позволяет принимать необходимые меры эпидемиологического контроля и использовать эффективную противовирусную терапию в отношении SARS-CoV-2.

Таким образом, сложно переоценить значимость мероприятий по вакцинации населения против сезонного гриппа в период пандемии COVID-19. Максимальный уровень охвата вакцинацией против сезонного гриппа позволит упростить диагностику и уменьшить вероятность коинфекции ВГ в период пандемии SARS-CoV-2-инфекции.

Целью настоящей работы было изучение взаимного влияния вакцин для профилактики гриппа и SARS-CoV-2 российского производства на формирование специфического поствакцинального иммунитета при одновременном введении лабораторным животным.

Материалы и методы

В исследовании использовали мышей линии BALB/c (гаплотип H-2^d) обоего пола массой 16–18 г. Животные были получены из питомника «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий ФМБА.

В исследовании использовали зарегистрированные на территории России вакцину для профилактики гриппа трёхвалентную инактивированную (Флю-М; СпбНИИВС ФМБА России), содержащую антигены ВГ типа А (H1N1, H3N2) и типа В; и вакцину для профилактики COVID-19 инактивированную, цельновирионную (КовиВак; ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН). В качестве контроля была использована «Вода для инъекций» («Микроген»).

Животные были разделены на группы по 20 мышей. Иммунизацию животных проводили внутримышечно (бедренная мышца) в дозах, рекомендованных производителями соответствующих вакцин. Животных вакцинировали препаратами КовиВак и/или Флю-М дважды с интервалом 14 сут для проведения сравнительных исследований иммунного ответа и оценки взаимного влияния препаратов при одновременном введении. При иммунизации двумя препаратами их вводили в разные конечности. Животным из группы контроля на 0-е и 14-е сутки эксперимента вводили воду для инъекций в объёме 0,5 мл.

У животных всех групп перед проведением 1-й (на 0-е сутки) и 2-й иммунизации (на 14-е сутки), а также на 28-е сутки эксперимента (14-е сутки

после 2-й иммунизации) производили забор крови из глазной вены. Образцы крови после центрифугирования разливали по пробиркам и хранили при –70°C для последующего одномоментного исследования. Специфические антитела (АТ) у иммунизированных животных определяли индивидуально в сыворотке крови каждого животного.

Все процедуры на отдельных мышках проводили в соответствии с Международными принципами «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей» ETS № 123 (Страсбург, 1986), Приказом Минздрава РФ от 01.04.2016 № 199Н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

Реакцию торможения гемагглютинации (РТГА) проводили в соответствии с протоколом ВОЗ [12] по ранее описанной методике [13] с тремя штаммами ВГ: А/H1N1 (Guangdong-Maonan/SWL1536/2019), А/H3N2 (Hong Kong/2671/2019), В (Washington/02/2019) из рабочей коллекции вирусов НИИВС им. И.И. Мечникова. Для статистической обработки полученные титры специфических АТ переводили в \log_{10} (lg), отрицательный результат (РТГА ≤ 10) приравнивали к 1 lg.

Имуноферментный анализ (ИФА) для выявления АТ к SARS-CoV-2 проводили с использованием тест-системы для определения IgG к протеинам N и S (subunit S2) вируса SARS-CoV-2 для лабораторного применения («НПФ Литех») в соответствии с инструкцией разработчика. Для статистической обработки полученный результат переводили в \log_{10} (lg), отрицательный результат (ИФА ≤ 100) приравнивали к 1 lg.

Реакцию нейтрализации (РН) для определения вируснейтрализующих АТ к SARS-CoV-2 проводили с использованием штамма PK35 SARS-CoV-2 из рабочей коллекции вирусов ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН. Перед проведением анализа готовили двукратные разведения образцов сывороток животных с использованием среды DMEM (ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН). Разведения сывороток смешивали с равными объёмами вирусной суспензии, содержащей 50 ТЦИД₅₀ на лунку. После 1 ч инкубации при 37°C смесь вирус + сыворотка вносили в монослой клеток Vero в 2 повторах. Параллельно контроль клеток Vero инкубировали с аналогичными разведениями неиммунной («–» контроль) и иммунной («+» контроль) мышинных сывороток (ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН). После 5-дневной инкубации при 37°C цитопатическое действие вируса оценивали с помощью светового микроскопа. Титр нейтрализующих АТ рассчитывали согласно методу G. Kärber¹.

¹ Kärber G. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Archiv f experimentel Pathol u Pharmakol. 1931; 162: 480–483. DOI: 10.1007/BF01863914.

Для статистической обработки полученный результат переводили в \log_2 , отрицательный результат ($PH \leq 2$) приравнивали к $1 \log_2$.

РН для определения нейтрализующих АТ к ВГ проводили по ранее описанной методике [13] с 3 штаммами ВГ: А/Н1N1 (Guangdong-Maonan/SWL1536/2019), А/Н3N2 (Hong Kong/2671/2019), В (Washington/02/2019) из рабочей коллекции вирусов НИИВС им. И.И. Мечникова. Для дальнейшей статистической обработки полученные титры специфических АТ переводили в Ig, отрицательный результат ($PH \leq 20$) приравнивали к $1 \log_2$.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием стандартного пакета программ «Microsoft Office Excel 2016». Данные титров специфических АТ по группам животных представлены в виде среднего геометрического (GMT) значения и стандартного отклонения среднего (SD). Достоверность различий сравниваемых величин оценивали с помощью парного *t*-критерия Стьюдента, парного, с двумя хвостами распределения. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Корреляцию между вируснейтрализующими АТ с соответствующими специфическими АТ в РТГА и в ИФА оценивали с помощью коэффициента Пирсона (*r*).

Результаты

Все животные до иммунизации не имели определяемых уровней специфических АТ ни в одном их проводимых тестах.

Формирование соответствующего специфического поствакцинального иммунитета было отмечено во всех группах животных, кроме контрольной. У животных контрольной группы специфические АТ не были обнаружены ни в одном из тестов, ни на одной из точек забора крови. За время наблюдения не погибло ни одно животное.

В РТГА отмечено формирование специфического иммунитета к 3 штаммам ВГ у животных, по-

лучивших Флю-М и Флю-М + КовиВак (табл. 1). Через 14 сут после 1-й иммунизации разница между этими группами по уровню АТ к ВГ была статистически недостоверной ($p = 0,08-0,16$). При сравнении уровня специфических АТ к ВГ после 1-й и 2-й иммунизации в обеих группах выявлено статистически достоверное увеличение уровня АТ ко всем штаммам ВГ, кроме штамма А/Н3N2 в группе животных, привитых Флю-М. Следует отметить, что после 1-й иммунизации уровень АТ к штамму ВГ А/Н3N2 был достоверно выше, чем уровни АТ к двум другим штаммам ВГ, в обеих группах ($p < 0,0005$). После 2-й иммунизации внутри обеих групп животных титры АТ к штаммам ВГ типа А практически не различались; а АТ к штамму В были достоверно ниже ($p < 0,05$). После 2-й иммунизации уровни специфических АТ в РТГА были достоверно выше у животных, получивших Флю-М + КовиВак, относительно группы животных, привитых только Флю-М ($p = 0,0001-0,002$). В группе животных, иммунизированных КовиВак, АТ к ВГ не определялись ни на одной из контрольных точек.

В результате иммунизации животных отмечено формирование вируснейтрализующих АТ к 3 штаммам ВГ в группах, получивших Флю-М и Флю-М + КовиВак (табл. 2). После 1-й иммунизации разница в уровнях вируснейтрализующих АТ к ВГ между группами была статистически недостоверна ($p = 0,10-0,99$). В динамике при сравнении уровня вируснейтрализующих АТ к ВГ у животных этих групп выявлено статистически достоверное увеличение уровня АТ ко всем штаммам ВГ, кроме штамма А/Н3N2, в группе животных, привитых Флю-М. Данный результат соответствует результатам, полученным в РТГА (табл. 1). Следует отметить, что после 1-й иммунизации уровень вируснейтрализующих АТ к штамму А/Н3N2 был достоверно выше, чем уровни АТ к двум другим штаммам ВГ, в обеих группах ($p < 0,05$). После 2-й иммунизации обнаружена статистически достовер-

Таблица 1. Уровень специфических АТ (Ig) к ВГ в РТГА у лабораторных животных после иммунизации Флю-М и КовиВак (GMT \pm SD)

Table 1. Levels of specific Abs (Ig) against IV in HIA in laboratory animals after immunization with Flu-M and CoviVac (GMT \pm SD)

День исследования Day of study	Флю-М Flu-M			Флю-М + КовиВак Flu-M + CoviVac			КовиВак CoviVac		
	Штамм ВГ / IV strain								
	А/Н1N1	А/Н3N2	В	А/Н1N1	А/Н3N2	В	А/Н1N1	А/Н3N2	В
14	1,38 \pm 0,20	1,80 \pm 0,20	1,25 \pm 0,22	1,59 \pm 0,38	1,98 \pm 0,30	1,41 \pm 0,35	H.o. N.d.	H.o. N.d.	H.o. N.d.
28	2,03 \pm 0,58	1,86 \pm 0,36	1,55 \pm 0,26	3,00 \pm 0,20	2,94 \pm 0,29	2,09 \pm 0,28	H.o. N.d.	H.o. N.d.	H.o. N.d.
<i>t</i> -test	0,0084	0,52177	0,01817	0,0009	0,0015	0,0039	–	–	–

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3: H.o. — не определялись, т.е. отсутствовали при проведении исследования.

Note. Here and in Tables 2, 3: N.d. — not detectable.

Таблица 2. Уровень вируснейтрализующих АТ к ВГ в РН (\log_2) у лабораторных животных после иммунизации Флю-М и КовиВак (GMT \pm SD)

Table 2. Levels of virus neutralizing Abs against IV in NT (\log_2) in laboratory animals after immunization with Flu-M and CoviVac (GMT \pm SD)

День исследования Day of study	Флю-М Flu-M			Флю-М + КовиВак Flu-M + CoviVac			КовиВак CoviVac		
	Штамм ВГ / IV strain								
	A/H1N1	A/H3N2	B	A/H1N1	A/H3N2	B	A/H1N1	A/H3N2	B
14	2,20 \pm 0,27	2,49 \pm 0,28	1,77 \pm 0,40	1,91 \pm 0,42	2,50 \pm 0,14	1,71 \pm 0,58	Н.о. N.d.	Н.о. N.d.	Н.о. N.d.
28	2,69 \pm 0,38	2,52 \pm 0,27	2,17 \pm 0,40	3,05 \pm 0,12	2,99 \pm 0,16	2,69 \pm 0,16	Н.о. N.d.	Н.о. N.d.	Н.о. N.d.
t-test	0,0038	0,8104	0,0426	0,0001	0,0002	0,0038	–	–	–

ная разница между группами животных по уровню вируснейтрализующих АТ к ВГ ($p = 0,0002-0,002$). Уровни вируснейтрализующих АТ после 2-й иммунизации были достоверно выше в группе животных, привитых Флю-М + КовиВак, что также согласуется с результатами РТГА (табл. 1). В обеих группах животных АТ к штаммам ВГ типа А были практически на одном уровне; достоверно ниже были АТ к штамму ВГ типа В ($p < 0,05$). В группе животных, иммунизированных КовиВак, нейтрализующие АТ к 3 штаммам ВГ не определялись ни на одной из контрольных точек (табл. 2). При расчёте корреляции между уровнем АТ к ВГ в РТГА и уровнем вируснейтрализующих АТ к ВГ в обеих группах животных после 1-й и 2-й вакцинации коэффициент корреляции Пирсона колебался от 0,60 до 0,87. Данные значения коэффициента Пирсона соответствуют значимой степени корреляции с достоверностью $p < 0,05$.

В табл. 3 представлены титры специфических АТ к SARS-CoV-2 в ИФА и РН. В результате иммунизации животных отмечено формирование специфических АТ к SARS-CoV-2 в группах, получивших КовиВак и Флю-М + КовиВак. Через 14 дней после 1-й иммунизации разница между уровнями специфических АТ была статистически не достоверна между данными группами в ИФА ($p = 0,10$) и РН ($p = 0,09$). При сравнении показателей иммунитета

животных внутри групп после 1-й и 2-й иммунизации выявлено статистически достоверное увеличение уровня АТ в ИФА и РН (табл. 3). После 2-й иммунизации разница между уровнями специфических АТ к SARS-CoV-2 в ИФА и РН в группах животных, привитых КовиВак и Флю-М + КовиВак, была статистически недостоверна ($p \geq 0,10$). В группе животных, иммунизированных Флю-М, специфические АТ к вирусу SARS-CoV-2 не определялись ни на одной из контрольных точек. Коэффициент корреляции Пирсона между уровнем АТ к SARS-CoV-2 в ИФА и в РН составил 0,89–0,94 в обеих группах животных после 1-й и 2-й вакцинации. Данные значения коэффициента Пирсона соответствуют значимой степени корреляции с достоверностью $p < 0,01$.

Обсуждение

В результате эксперимента, предпринятого для оценки взаимного влияния иммунизации отечественными препаратами КовиВак и Флю-М, выявлено отсутствие негативного влияния как вакцины Флю-М на формирование иммунитета к вирусу SARS-CoV-2, так и вакцины КовиВак на формирование иммунитета к ВГ при одновременном введении лабораторным животным.

Формирование иммунитета к ВГ выявлено в группах животных КовиВак и Флю-М + КовиВак,

Таблица 3. Уровень специфических АТ к SARS-CoV-2 в РН (\log_2) и ИФА (Ig) у лабораторных животных после иммунизации Флю-М и КовиВак (GMT \pm SD)

Table 3. Levels of specific Abs against SARS-CoV-2 in NT (\log_2) and ELISA (Ig) in the laboratory animals after the immunization with Flu-M and CoviVac (GMT \pm SD)

День исследования Day of study	Флю-М Flu-M		Флю-М + КовиВак Flu-M + CoviVac		КовиВак CoviVac	
	РН / NA	ИФА / ELISA	РН / NA	ИФА / ELISA	РН / NA	ИФА / ELISA
14	Н.о. N.d.	Н.о. N.d.	2,53 \pm 1,66	2,53 \pm 1,66	2,53 \pm 1,66	1,90 \pm 0,75
28	Н.о. N.d.	Н.о. N.d.	5,75 \pm 1,14	5,75 \pm 1,14	5,75 \pm 1,14	2,76 \pm 0,28
t-test	–	–	0,0029	0,0029	0,0029	0,0249

что подтверждается наличием специфических АТ в сыворотке крови животных, определённых как в РТГА, так и в РН. Средние показатели АТ к ВГ в обеих группах животных были на достаточно высоком уровне, аналогичном описанному ранее в эксперименте по двукратной вакцинации мышей BALB/c инактивированными отечественными вакцинами для профилактики гриппа [13]. Интересно, что после 1-й иммунизации разница в уровнях специфических АТ как в РТГА, так и в РН между группами, получившими КовиВак и Флю-М + КовиВак, практически отсутствовала. Однако после 2-й иммунизации выявлено очевидное преимущество одновременной иммунизации препаратами КовиВак и Флю-М, что подтверждается статистически достоверной разницей между средними показателями уровней специфических АТ к ВГ как в РТГА, так и в РН. Соотношение между уровнями специфических АТ к 3 штаммам ВГ сохранялось схожим как в динамике в пределах одной группы, так и между группами на соответствующих точках исследования. Уровень АТ к ВГ у обоих штаммов типа А был практически одинаковым и статистически более значим, чем уровень АТ к штамму типа В линии Victoria в обеих группах, как после 1-й, так и после 2-й иммунизации животных. Полученные в данном эксперименте данные сопоставимы с ранее опубликованными [13, 14].

Формирование поствакцинального иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 выявлено в группах животных, получивших КовиВак и Флю-М + КовиВак, что подтверждается наличием в сыворотке крови животных специфических АТ, определённых как в ИФА, так и в РН. Интересно, что после 1-й иммунизации кажущаяся разница в уровнях специфических АТ как в ИФА, так и в РН между группами, получившими КовиВак и Флю-М + КовиВак, оказалась статистически недостоверной. А после 2-й иммунизации разница в уровнях АТ как в ИФА, так и в РН между группами отсутствовала.

В результате проведённых исследований выявлено не только отсутствие негативного влияния на иммунитет при одновременной иммунизации вакцинами для профилактики гриппа и COVID-19, но, более того, обнаружено определённое усиливающее влияние на уровень специфических АТ к ВГ, что было несколько неожиданно. Данный феномен, являясь однозначно положительным, требует дальнейшего изучения для выяснения механизмов усиления иммунного ответа к ВГ. Вакцина КовиВак является инактивированной и цельновирионной и содержит гидроксид алюминия. Учитывая тот факт, что вакцины КовиВак и Флю-М вводились в разные конечности животного, можно предположить отсутствие адъювантного влияния гидроксида алюминия на формирование специфических АТ к ВГ.

Проведённый несколько ранее эксперимент с одновременной вакцинацией трансгенных мышей вакцинами для профилактики гриппа и COVID-19 продемонстрировал формирование нейтрализующих АТ как к ВГ, штамм А/Н1N1, так и к вирусу SARS-CoV-2. Более того, был продемонстрирован протективный эффект при последующем заражении лабораторных животных ВГ и SARS-CoV-2 [11]. В эксперименте L. Bao и соавт. [11], как и в нашем исследовании, применяли инактивированную вакцину для профилактики COVID-19 («PiCoVacc», «Sinovac Biotech Ltd.») и инактивированную вакцину против гриппа («Anflu», «Sinovac Biotech Ltd.»). При сравнении уровней АТ к ВГ, штамм А/Н1N1, отмечалась тенденция к более высокому уровню у группы животных, привитых одновременно двумя вакцинами, относительно группы животных, привитых только противогриппозной вакциной. В этом же исследовании изучалось соотношение субпопуляций Т-лимфоцитов CD4⁺/CD8⁺. При анализе баланса иммунного ответа субпопуляциями клеток Th1 и Th2, важного показателя формирования адаптивного иммунитета, определённое преимущество было у группы животных, привитых одновременно обеими вакцинами, которое подтверждалось повышенными уровнями интерлейкина-4 в сыворотке их крови [11]. В отличие от нашего исследования, группы животных были небольшими ($n = 6$); сами животные были трансгенными Tg (K18-hACE2) для изучения АТ-зависимого эффекта; иммунизация вакциной для профилактики гриппа была проведена однократно [11]. В нашем же исследовании мыши линии BALB/c были привиты дважды гриппозной вакциной, как было описано ранее [13].

Результаты, полученные в настоящем исследовании, подтверждают положительный эффект от одновременной иммунизации лабораторных животных отечественными вакцинами для профилактики гриппа Флю-М и для профилактики коронавирусной инфекции КовиВак, подтверждённый формированием специфических вируснейтрализующих АТ. Обнаруженное нами усиление иммунного ответа к ВГ у лабораторных животных при одновременной иммунизации является положительным результатом, однако требует дальнейшего изучения механизма её возникновения.

Заключение

В ситуации, когда, весьма вероятно, прививаться против COVID-19 надо будет с определённой периодичностью, необходимо планировать стратегию иммунизации, особенно пожилого населения страны, с учётом уже рекомендованных вакцин, как например, вакцин против пневмококка и гриппа. Своевременная вакцинация может предотвратить одновременное заражение и благоприятно повли-

ять на исход такого заболевания, как COVID-19. Международный Совет по иммунизации взрослого населения (ICAI), отметив высокий риск тяжёлого течения COVID-19 в результате коинфицирования и последующего, вслед за перенесённым COVID-19, инфицирования ВГ, призывает мировое сообщество и правительства расставить приоритеты и разработать отдельную программу иммунизации взрослого населения [15].

Результаты, полученные в настоящем исследовании, подтверждают формирование специфического поствакцинального иммунитета к ВГ и SARS-CoV-2 при одновременной иммунизации лабораторных животных отечественными вакцинами для профилактики гриппа Флю-М и для профилактики коронавирусной инфекции КовиВак. Проведённые лабораторные исследования позволяют предположить возможность, при необходимости, одновременной иммунизации взрослого населения страны вакцинами для профилактики гриппа и COVID-19.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ/REFERENCES

1. Li Q., Tang B., Bragazzi N.L., Xiao Y., Wu J. Modeling the impact of mass influenza vaccination and public health interventions on COVID-19 epidemics with limited detection capability. *Math. Biosci.* 2020; 325: 108378. <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2020.108378>
2. Grohskopf L.A., Alyanak E., Broder K.R., Blanton L.H., Fry A.M., Jernigan D.B., et al. Prevention and control of seasonal influenza with vaccines: recommendations of the advisory committee on immunization practices – United States, 2020–21 Influenza Season. *MMWR Recomm. Rep.* 2020; 69(8): 1–24. <https://doi.org/10.15585/mmwr.rr6908a1>
3. Del Riccio M., Lorini C., Bonaccorsi G., Paget J., Caini S. The association between influenza vaccination and the risk of SARS-CoV-2 infection, severe illness, and death: A systematic review of the literature. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2020; 17(21): 7870. <https://doi.org/10.3390/ijerph17217870>
4. Schlegelhauf P. Influenza vaccine enlisted to prevent SARS confusion. *Lancet.* 2003; 362(9386): 809. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(03\)14301-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)14301-2)
5. Belingheri M., Paladino M.E., Latocca R., De Vito G., Riva M.A. Association between seasonal flu vaccination and COVID-19 among healthcare workers. *Occup. Med. (Lond.)* 2020; 70(9): 665–71. <https://doi.org/10.1093/occmed/kqaa197>

Информация об авторах

Игнатъев Георгий Михайлович[✉] — д.м.н., профессор, зам. руководителя направления по качеству и инновационным разработкам ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия, ignatjev_gm@chumakovs.su, <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>

Ленева Ирина Анатольевна — д.б.н., зав. лаб. экспериментальной вирусологии Отдела вирусологии им. О.Г. Анжапаридзе НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7755-2714>

Отрашевская Елена Викторовна — начальник отдела научных исследований и опытно-конструкторских работ СПбНИИВС, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2491-4072>

Козловская Любовь Игоревна — к.б.н., в.н.с. ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3029-1035>

6. Wolff G.G. Influenza vaccination and respiratory virus interference among department of defense personnel during the 2017–2018 influenza season. *Vaccine.* 2020; 38(2): 350–4. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.10.005>
7. Cocco P., Meloni F., Coratza A., Schirru D., Campagna M., De Matteis S. Vaccination against seasonal influenza and socio-economic and environmental factors as determinants of the geographic variation of COVID-19 incidence and mortality in the Italian elderly. *Prev. Med.* 2021; 143: 106351. <https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2020.106351>
8. Skowronski D.M., Zou M., Clarke Q., Chambers C., Dickinson J.A., Sabaiduc S., et al. Influenza vaccine does not increase the risk of coronavirus or other noninfluenza respiratory viruses: retrospective analysis from Canada, 2010–2011 to 2016–2017. *CID.* 2020; 71(16): 2285–8. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa626>
9. Lai C.C., Wang C.Y., Hsueh P.R. Co-infections among patients with COVID-19: The need for combination therapy with non-anti-SARS-CoV-2 agents? *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2020; 53(4): 505–12. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.05.013>
10. Stowe J., Tessier E., Zhao H., Guy R., Muller-Pebody B., Zambon M., et al. Interactions between SARS-CoV-2 and influenza, and the impact of coinfection on disease severity: a test-negative design. *Int. J. Epidemiol.* 2021; 50(4): 1124–33. <https://doi.org/10.1093/ije/dyab081>
11. Bao L., Deng W., Qi F., Lv Qi., Song Zh., Liu J., et al. Sequential infection with H1N1 and SARS-CoV-2 aggravated COVID-19 pathogenesis in a mammalian model, and co-vaccination as an effective method of prevention of COVID-19 and influenza. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2021; 6(1): 200. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00618-z>
12. WHO. Global Influenza Surveillance Network. Manual for the Laboratory Diagnosis and Virological Surveillance of Influenza. Geneva; 2011. Available at: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44518/9789241548090_eng.pdf
13. Shanko A., Shuklina M., Kovaleva A., Zabrodskaya Y., Vidyeva I., Shaldzhya A., et al. Comparative immunological study in mice of inactivated influenza vaccines used in the Russian immunization program. *Vaccines.* 2020; 8(4): 756. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040756>
14. Ye H., Jia S., Zhang Y., Li J., Zhu F. Safety and immunogenicity of a novel quadrivalent subunit influenza vaccine in animal models. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2020; 16(11): 2719–26. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1737456>
15. Privor-Dumm L.A., Poland G.A., Barratt J., Durrheim D.N., Knoll M.D., Vasudevan P., et al. A global agenda for older adult immunization in the COVID-19 era: A roadmap for action. *Vaccine.* 2021; 39(37): 5240–50. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.06.082>

Information about the authors

Georgy M. Ignatyev[✉] — D. Sci. (Med.), Professor, Deputy Head, Department for quality and innovative development, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products, Moscow, Russia, e-mail: ignatjev_gm@chumakovs.su, <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>

Irina A. Leneva — D. Sci. (Med.), Head, Laboratory of experimental virology, Department of virology named after O.G. Anjaparidze, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7755-2714>

Alena V. Atrasheuskaya — Head, R&D department, Saint-Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Serums, Saint Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2491-4072>

Liubov I. Kozlovskaya — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3029-1035>

Карташова Надежда Петровна — н.с. лаб. экспериментальной вирусологии Отдела вирусологии им. О.Г. Анджаридзе НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2096-5080>

Федякина Ирина Тимофеевна — с.н.с. лаб. экспериментальной вирусологии Отдела вирусологии им. О.Г. Анджаридзе НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6421-9632>

Шустова Елена Юрьевна — н.с. лаб. молекулярной биологии вирусов ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1314-0152>

Синюгина Александра Александровна — руководитель направления по качеству и инновационным разработкам ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7251-6570>

Зверев Виталий Васильевич — д.м.н., профессор, зав. каф. микробиологии, вирусологии, иммунологии ПМГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5808-2246>

Трухин Виктор Павлович — к.ю.н., директор СПбНИИВС ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6635-363X>

Ишмухаметов Айдар Айратович — д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, генеральный директор ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6130-4145>

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 21.07.2021;
принята к публикации 26.09.2021;
опубликована 25.12.2021

Nadezhda P. Kartashova — researcher, Laboratory of experimental virology, Department of virology named after O. G. Anjaparidze, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2096-5080>

Irina T. Fediakina — senior researcher, Laboratory of experimental virology, Department of virology named after O.G. Anjaparidze, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6421-9632>

Elena Yu. Shustova — researcher, Laboratory of molecular biology of viruses, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1314-0152>

Aleksandra A. Sinyugina — Head, Quality and innovation development department Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7251-6570>

Vitaly V. Zverev — D. Sci. (Biol.), RAS Full Member, Professor, Head, Department of microbiology, virology and immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5808-2246>

Victor P. Trukhin — Cand. Sci. (Law), Director, Saint-Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Serums, Saint Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6635-363X>

Aidar A. Ishmukhametov — D. Sci. (Med.), Professor, Corresponding member of RAS, General director, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6130-4145>

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 21.07.2021;
accepted for publication 26.09.2021;
published 25.12.2021



Анализ изменения состояния влагалищной микрофлоры у женщин репродуктивного возраста в условиях трёхсуточной «сухой» иммерсии без использования средств профилактики

Ильин В.К.¹, Бояринцев В.В.², Комиссарова Д.В.^{1✉}, Тонян К.А.^{1,3}, Усанова Н.А.¹, Морозова Ю.А.¹, Муравьева В.В.⁴, Байрамова Г.Р.⁴, Припутневич Т.В.⁴

¹ Государственный научный центр Российской Федерации — Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, Москва, Россия;

² Центральная государственная медицинская академия Управления делами Президента РФ, Москва, Россия;

³ Клиническая больница № 1 (Волынская) Управления делами Президента РФ, Москва, Россия;

⁴ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова, Москва, Россия

Аннотация

Введение. В связи с возрастающим участием женщин в космических полётах встают вопросы о влиянии факторов полёта на состояние женского организма и, в частности, на стабильность, видовые и количественные изменения микрофлоры влагалища. Для изучения влияния отдельных факторов космического полёта на организм наиболее удобными являются модельные эксперименты, в частности, «сухая» иммерсия.

Целью данной работы является сравнительная оценка состояния микробиоты влагалища у 6 женщин-испытателей до и после 3-суточного пребывания в «сухой» иммерсии.

Материалы и методы. Всем испыталелям выполнена микроскопия вагинального отделяемого, окрашенного по Граму, и культуральное исследование в соответствии с медицинской технологией «Интегральная оценка состояния микробиоты влагалища. Диагностика оппортунистических вагинитов». Видовую идентификацию микроорганизмов проводили методом MALDI-TOF-MS-анализа.

Для количественной оценки изменения состояния влагалищной микрофлоры и микрофлоры цервикального канала использовали эубиотический индекс, отражающий отношение числа положительных состояний микробиоты (до эксперимента — по отношению к норме, после эксперимента — по отношению к состоянию до эксперимента) к числу отрицательных.

Результаты. После 3-суточной «сухой» иммерсии у испыталелей, которые до изоляции имели высокий титр аэробных микроорганизмов, количество аэробной микрофлоры существенно увеличилось, при этом количество протективных видов снижалось. У испыталелей, которые до изоляции имели низкий титр аэробных микроорганизмов, количество аэробной микрофлоры уменьшилось, а количество лактобацилл повысилось, что говорит об активации колонизационной резистентности микрофлоры влагалища. У испыталелей, у которых до изоляции обнаруживалась существенная обсеменённость анаэробной условно-патогенной микрофлорой, количество всех анаэробов, включая лактобациллы, снижалось. Эубиотический индекс, рассчитанный для цервикального канала, после 3-суточной иммерсии снизился. Полученные данные свидетельствуют о том, что после 3-суточной изоляции наблюдалось ухудшение состояния микрофлоры.

Ключевые слова: вагинальная микрофлора, «сухая» иммерсия, факторы космического полёта

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен биоэтической комиссией ГНЦ РФ – ИМБП РАН (протокол № 544 от 16.06.2020).

Источник финансирования. Работа выполнена при частичной поддержке базовой тематики РАН № 64.2 «Исследование функции желудочно-кишечного тракта при адаптации организма человека к искусственной среде обитания и способы коррекции дисбактериозов с помощью аутопробиотиков», а также с использованием Уникальной научной установки «Трансгенбанк».

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

Для цитирования: Ильин В.К., Бояринцев В.В., Комиссарова Д.В., Тонян К.А., Усанова Н.А., Морозова Ю.А., Муравьева В.В., Байрамова Г.Р., Припутневич Т.В. Анализ изменения состояния влагалищной микрофлоры у женщин репродуктивного возраста в условиях трёхсуточной «сухой» иммерсии без использования средств профилактики. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(6):657–663.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-150>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-150>

Analysis of changes in the state of vaginal microflora in women of reproductive age under conditions of a three-day "dry" immersion without the use of prophylaxis

Vyacheslav K. Ilyin¹, Valery V. Boyarintsev², Darya V. Komissarova^{1✉}, Konstantin A. Toniyan^{1,3}, Nonna A. Usanova¹, Yuliya A. Morozova¹, Vera V. Muravieva⁴, Gyuldana R. Bayramova⁴, Tatyana V. Priputnevich⁴

¹Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

²Central State Medical Academy of the Presidential Administration of the Russian Federation, Moscow, Russia;

³Clinical Hospital No. 1 (Volynskaya) of the Presidential Administration of the Russian Federation, Moscow, Russia;

⁴Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Currently, the participation of women in space flights is increasing. In this regard, questions about the influence of space factors on the state of the female body arise inevitably. Model experiments, in particular, "dry" immersion, are most convenient for studying the influence of individual factors of space flight on the organism. The **aim** of this work is a comparative assessment of the state of the vaginal microbiota of 6 female volunteers before and after three-day "dry" immersion.

Materials and methods. Microbial samples of all volunteers were stained according to Gram with a sequential culture study in accordance with the medical technology. The species identification of microorganisms was performed by MALDI-TOF-MS analysis using an Autoflex III time-of-flight mass spectrometer with Maldi BioTyper software.

To assess changes in the state of the vaginal microflora and microflora of the cervical canal, eubiotic index was used. It reflects the number of positive states of microbiota to the number of negative ones.

Results. After 3 days of "dry" immersion volunteers, who had high titer of aerobic microorganisms before isolation, had significant increase of the amount of aerobic microorganisms, while the number of lactobacilli decreased. The other group of volunteers showed activation of colonization resistance of the vaginal microflora. Volunteers, who had a significant contamination with anaerobic opportunistic microflora before isolation, had reduction of the number of all anaerobes, including lactobacilli. The eubiotic index, calculated for the cervical canal, decreased after 3 days of immersion. The data obtained indicate that after 3 days of isolation, the state of the microflora has deteriorated.

Keywords: *vaginal microflora, dry immersion, space flight factors*

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Bioethics Committee of the Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences (Protocol No. 544, June 16, 2020).

Funding source. The work was carried out with partial support of the basic theme of the Russian Academy of Sciences No. 64.2 "Study of the function of the gastrointestinal tract during adaptation of the human body to an artificial environment and methods of correction of dysbacteriosis using autoprobiotics" and with usage of the unique scientific equipment "Transgenbank".

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

For citation: Ilyin V.K., Boyarintsev V.V., Komissarova D.V., Toniyan K.A., Usanova N.A., Morozova Yu.A., Muravieva V.V., Bayramova G.R., Priputnevich T.V. Analysis of changes in the state of vaginal microflora in women of reproductive age under conditions of a three-day "dry" immersion without the use of prophylaxis. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(6):657–663. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-150>

Введение

В настоящее время участие женщин в космических полётах и наземных модельных экспериментах возрастает. В связи с этим неизбежно встают вопросы о влиянии факторов полёта на состояние женского организма и, в частности, на стабильность, видовые и количественные изменения микрофлоры влагалища.

Известно, что факторы космической миссии являются причиной формирования стресса и негативно сказываются на микрофлоре верхних дыхательных путей и кишечника [1]. Наблюдается увеличение роста условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) и снижение титра протективных групп бактерий, что, в совокупности с длительным нахождением в замкнутом пространстве космиче-

ского корабля или гипотетической лунной станции, является серьёзным фактором риска возникновения воспалительных процессов в репродуктивной системе женщин.

Поддержание постоянства микрофлоры влагалища является важным для здоровья и качества жизни женщин. Изменение рациона питания, особенностей гигиенических процедур, стресс — всё это является фактором смещения баланса влагалищной микрофлоры и снижения естественного колонизационно-резистентного барьера [2]. Это проявляется в первую очередь в снижении количества *Lactobacillus* spp. и увеличении условно-патогенной факультативно и облигатно-анаэробной микрофлоры, характерной для женщин с воспалительными заболеваниями органов малого таза [3].

Для изучения влияния отдельных факторов космического полёта на системы организма наиболее удобными являются модельные эксперименты, в частности, «сухая» иммерсия (СИ). Во время эксперимента испытуемые находятся в имитируемой невесомости и испытывают влияние целого спектра факторов космического полёта: гиподинамию, перераспределение жидких сред [4]. Во время эксперимента испытуемый, одетый в нижнее бельё, укладывается на платформу на гидроизолирующую плёнку в иммерсионную ванну эргономического дизайна, заполненную водой. Иммерсионная ванна сконструирована таким образом, что, когда платформа опускается, испытуемый оказывается погруженным в воду полностью, за исключением головы. Таким образом, после погружения испытуемый находится в безопорном подвешенном состоянии: имитируемой невесомости. Испытуемому позволяет покидать ванну только на 10 мин в сутки для принятия душа и совершения гигиенических процедур.

Целью данной работы является сравнительная оценка состояния микробиоты влагалища у женщин-испытуемых до эксперимента и по завершении 3-суточного пребывания в условиях СИ.

Материалы и методы

Эксперимент одобрен биоэтической комиссией ГНЦ РФ – ИМБП РАН (протокол № 544 от 16.06.2020).

В исследование включены 6 женщин-испытуемых репродуктивного возраста, которые во время эксперимента не принимали антибактериальные препараты и иные средства, способные оказать влияние на микрофлору влагалища и цервикального канала. Женщины находились в иммерсионной ванне в течение 3 сут. Начало эксперимента для каждого испытуемого определяли индивидуально из расчёта, что окончание пребывания в условиях СИ попадёт на 9–10-й дни менструального цикла.

Отделяемое влагалища и цервикального канала отбирали на 10–11-й дни менструального цикла

дважды: до начала эксперимента и сразу после его завершения.

Микробиологический анализ состава микробиоты влагалища и цервикального канала проводили на базе Института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова.

Всем испытуемым выполнены микроскопия вагинального отделяемого, окрашенного по Граму, и культуральное исследование в соответствии с медицинской технологией «Интегральная оценка состояния микробиоты влагалища. Диагностика оппортунистических вагинитов» [5]. Взятие материала осуществляли стерильным дакроновым тампоном из заднего свода влагалища и после обработки шейки стерильным ватным тампоном — из цервикального канала в пробирки с транспортной средой Эймса («Medical Wire»). Вагинальное содержимое и отделяемое цервикального канала засеивали на селективные и неселективные агаризованные плотные питательные среды. Для выделения факультативно-анаэробных микроорганизмов использовали колумбийский агар, хромогенную прозрачную среду Brilliance («Oxoid»), маннит-солевой агар («Himedia»), энтерококковый агар, среду Эндо и агар Сабуро (ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии). Инкубировали посеvy в условиях CO₂-инкубатора («Jouan»). Лактобациллы культивировали на среде лактобакагар (ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии), строгие анаэробы — на прeredуцированном агаре Шедлера («Oxoid») с необходимыми добавками в условиях анаэробного бокса («Whitley DG 250 Anaerobic Workstation») в атмосфере трёхкомпонентной газовой смеси (N₂ 80%, CO₂ 10%, H₂ 10%). Видовую идентификацию микроорганизмов проводили методом MALDI-TOF-MS-анализа с использованием времяпролётного масс-спектрометра «Autoflex III» с программным обеспечением «Maldi BioTyper v.3.0» («Bruker Daltoniks»).

Для количественной оценки изменения состояния влагалищной микрофлоры и микрофлоры цервикального канала использовали эубиотический индекс (E_i), отражающий отношение числа положительных состояний микробиоты (до эксперимента по отношению к норме и после эксперимента по отношению к состоянию до эксперимента) к числу отрицательных. Повышение E_i означает улучшение состояния микробиоты по определённому показателю (например, после эксперимента выявлены увеличение или стабильно высокий титр протективных групп микроорганизмов или снижение титра УПМ). Значение E_i меньше 1,0 означает, что количество негативных показателей микробиоты преобладает над количеством положительных, что соответствует дисбиозу или близкому к нему состоянию.

Учитывая малое количество испытуемых, достоверность различия результатов по E_i до и после СИ оценивали с применением дисперсионного анализа для малых выборок (среднее значение \pm стандартное отклонение) [6]. Анализ проводили с помощью пакета программ для статистической обработки данных «Minitab».

Результаты и обсуждение

Все выделенные микроорганизмы разделены на 3 группы:

- 1-я группа — факультативно-анаэробные УПМ (включая дрожжевые грибы *Candida albicans*), присутствие которых в высоких титрах является риском развития аэробного вагинита и кандидозного вульвовагинита;
- 2-я группа — облигатно-анаэробные и микроаэрофильные УПМ (включая *Gardnerella vaginalis*), ассоциированные с бактериальным вагинозом;
- 3-я группа — *Lactobacillus* spp. [7–9].

Испытуемые были разделены на 2 группы (по 3 человека в каждой группе) в зависимости от оцениваемого параметра.

Для оценки риска развития и усугубления аэробного вагинита в отдельную группу выделены те волонтеры, у которых изначально наблюдалось значительное количество облигатной (главной) и факультативной (сопутствующей) факультативно-анаэробной микрофлоры: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Enterococcus* spp., *C. albicans*.

Аналогично для оценки риска и усугубления бактериального вагиноза были отобраны волонтеры, у которых имелось некоторое разнообразие строго анаэробных микроорганизмов (*Porphyromonas somerae*, *Prevotella bivia*) и *G. vaginalis*.

Кроме оценки изменений по выбранному параметру, в обеих группах также оценивалось количество протективной микрофлоры, т.е. *Lactobacillus* spp. Обращает на себя внимание небольшое снижение E_i , рассчитанного для всей микрофлоры, с 1,25 до СИ до 1,0 после СИ, что указывает на некоторую дестабилизацию состояния микробиоты после 3-суточной СИ.

В группе риска развития аэробного вагинита отмечено ухудшение состояния микробиоты влагалища и по факультативно-анаэробным УПМ, и по протективной микрофлоре (рис. 1): E_i снижается, что свидетельствует об уменьшении позитивных изменений микробиоты и увеличении негативных.

У некоторых испытуемых стали появляться виды УПМ, которые ранее не выявлялись, причём в титрах от 10^3 КОЕ/мл и выше. Также отмечено резкое уменьшение количества *Lactobacillus* spp.

В группе испытуемых, у которых не выявлено изначально высокой обсеменённости факультатив-

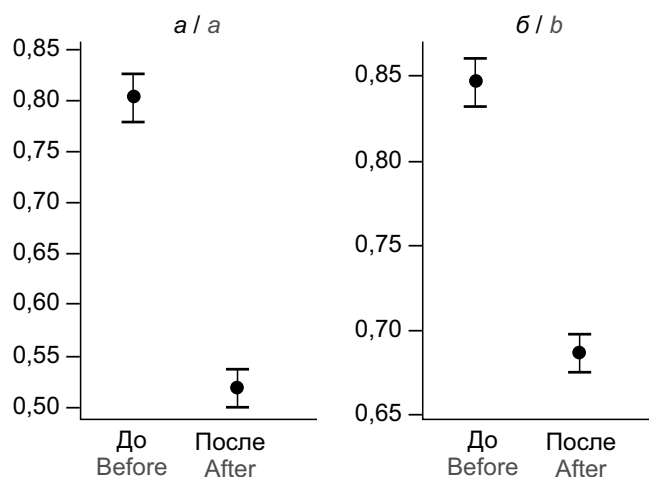


Рис. 1. E_i факультативно-аэробной (а) и протективной (б) микрофлоры влагалища до и после краткосрочной СИ в группе риска развития аэробного вагинита.

Fig. 1. Eubiotic index of facultative aerobic (a) and protective (b) vaginal microflora before and after short-term "dry" immersion in the risk group for developing aerobic vaginitis.

но-анаэробными микроорганизмами, E_i по факультативно-анаэробным микроорганизмам увеличился, как и индекс по протективной группе, что говорит об активации колонизационной резистентности и вытеснении факультативных анаэробов протективными группами *Lactobacillus* (рис. 2).

При анализе облигатно-анаэробной микрофлоры выявлено увеличение E_i в группе риска развития бактериального вагиноза (рис. 3), что свидетельствует о некотором улучшении ситуации. При этом E_i по *Lactobacillus* spp. снизился, в то время как в группе испытуемых, у которых изначально не бы-

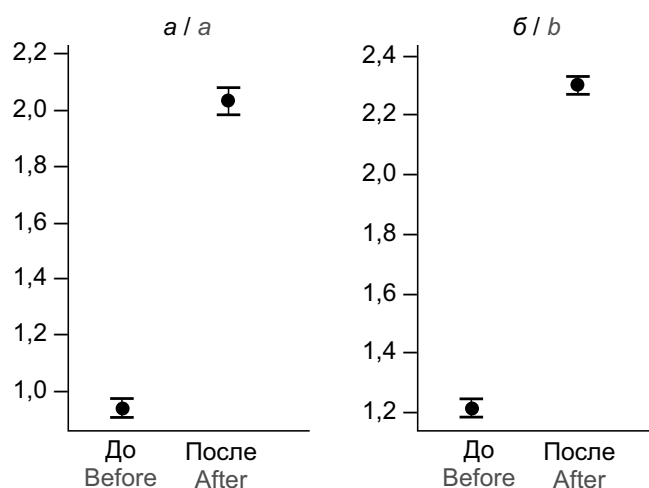


Рис. 2. E_i факультативно-аэробной (а) и протективной (б) микрофлоры влагалища до и после краткосрочной СИ в группе, не находящейся в зоне риска развития аэробного вагинита.

Fig. 2. Eubiotic index of facultative aerobic (a) and protective (b) vaginal microflora before and after short-term "dry" immersion in a group not at risk of developing aerobic vaginitis.

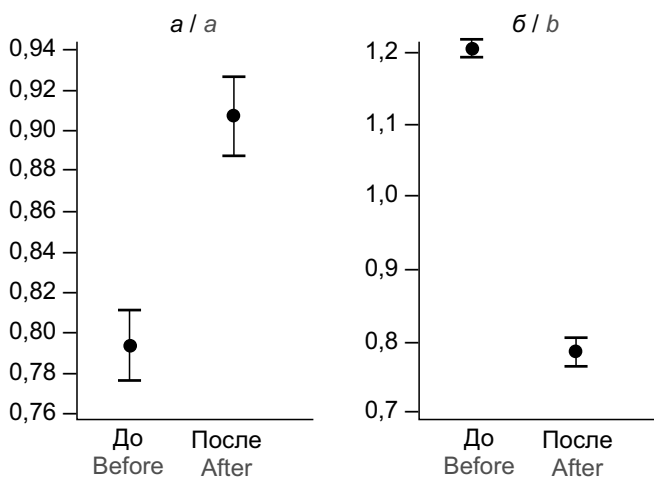


Рис. 3. E_i факультативно-анаэробной (а) и протективной (б) микрофлоры влагалища до и после краткосрочной СИ в группе, находящейся в зоне риска развития бактериального вагиноза.

Fig. 3. Eubiotic index of facultative anaerobic (a) and protective (b) vaginal microflora before and after short-term "dry" immersion in a group at risk of developing bacterial vaginosis.

ло строго анаэробных УПМ, он оставался стабильным, хотя и несколько ниже 1,0, что указывает на незначительное преобладание негативных изменений над позитивными.

В силу меньшего видового разнообразия микробиоты цервикального канала нами оценены изменения до и после 3-суточной СИ у всех испытуемых (6 человек) без разделения на группы. У всех испытуемых отмечено снижение E_i с 1,0 до 0,44, при этом наблюдалось достоверное снижение количества лактобацилл всех видов.

Согласно данным литературы, у пациенток с диагностированными воспалительными заболеваниями придатков матки при исследовании микрофлоры влагалища выявляется достоверное превышение концентрации стафилококков, кишечной палочки, гарднереллы и стрептококков над количеством лактобацилл [3]. В проведенном нами исследовании у половины испытуемых отмечены увеличение аэробной микрофлоры и снижение количества *Lactobacillus*, что свидетельствует об увеличении риска развития воспалительных заболеваний органов малого таза.

Следует отметить, что испытуемые, у которых преобладали лактобациллы вида *L. crispatus* в целом имели меньший титр УПМ. У одной женщины-испытателя наблюдалась элиминация *L. crispatus* после СИ и появление *S. albicans* в титре 10^4 КОЕ/мл. Полученные данные согласуются с проводимыми ранее исследованиями, свидетельствующими о том, что данный вид лактобацилл проявляет хорошую антагонистическую активность в отношении *E. coli* и *Candida* spp. и является перспективным пробиотическим микроорганизмом [10, 11].

Выводы

1. После 3-суточной иммерсии в целом наблюдалось ухудшение состояния микрофлоры всех волонтеров.

2. У испытуемых, которые до иммерсии имели высокий титр аэробных микроорганизмов, количество аэробной микрофлоры существенно увеличилось, при этом количество протективных видов снижалось, что свидетельствует о повышении риска развития аэробного вагинита в условиях, создаваемых длительной иммерсией.

3. У испытуемых, которые до иммерсии имели низкий титр аэробных микроорганизмов, количество аэробной микрофлоры уменьшилось, а количество лактобацилл повысилось, что говорит об активации колонизационной резистентности микрофлоры влагалища.

4. У испытуемых, у которых до иммерсии обнаруживалась существенная обсемененность анаэробной УПМ, количество всех анаэробов, включая лактобациллы, снизилось, что подтверждает сделанное выше предположение о повышении риска возникновения воспалительных заболеваний влагалища.

5. Эубиотический индекс, рассчитанный для цервикального канала, после 3-суточной СИ снизился. Это говорит об ухудшении состояния микрофлоры данного биотопа.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Turrone S., Magnani M., Кс P., Lesnik P., Vidal H., Heer M. Gut microbiome and space travelers' health: state of the art and possible pro/prebiotic strategies for long-term space missions. *Front. Physiol.* 2020; 11: 553929. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.553929>
- Кира Е.Ф. *Бактериальный вагиноз (клиника, диагностика, лечение)*: Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. СПб.: 1995.
- Тонян К.А., Арютин Д.Г., Белоусова А.А. Репродуктивное здоровье женщин после хирургического лечения острых гнойных воспалительных заболеваний придатков матки. *Мать и дитя в Кузбассе*. 2018; (4): 37–43.
- Tomilovskaya E., Shigueva T., Sayenko D., Rukavishnikov I., Kozlovskaya I. Dry immersion as a ground-based model of microgravity physiological effects. *Front. Physiol.* 2019; 10: 284. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00284>
- Анкирская А.С., Муравьева В.В. Интегральная оценка состояния микробиоты влагалища. Диагностика оппортунистических вагинитов. *Акушерство и гинекология: новости, мнения, обучение*. 2020; 8(1): 69–76. <https://doi.org/10.24411/2303-9698-2020-11009>
- Кулаичев А.П. *Методы и средства комплексного статистического анализа данных: Учебное пособие*. М.: ИНФРА-М; 2017.
- Савичева А.М., Тапильская Н.И., Шипицына Е.В., Воробьева Н.Е. Бактериальный вагиноз и аэробный вагинит как основные нарушения баланса вагинальной микрофлоры. Особенности диагностики и терапии. *Акушерство и гинекология*. 2017; (5): 24–31. <https://doi.org/10.18565/aig.2017.5.24-31>
- Мелкумян А.Р. *Инновационные методы видовой идентификации лактобактерий в оценке состояния микробиоты влагалища у беременных женщин*: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. М.; 2013.

9. Gladysheva I., Cherkasov S. Corynebacterium species in the female genital tract – pathogens or potential probiotics. *Int. J. Pharma Bio Sci.* 2018, 9(4): 265–72. <https://doi.org/10.22376/ijpbs.2018.9.4.b265-272>
 10. Hütt P., Lapp E., Štšepetova J., Smidt I., Taelma H., Borovkova N., et al. Characterisation of probiotic properties in human vaginal lactobacilli strains. *Microb. Ecol. Health Dis.* 2016; 27: 30484. <https://doi.org/10.3402/mehd.v27.30484>
 11. He Y., Niu X., Wang B., Na R., Xiao B., Yang H. Evaluation of the inhibitory effects of *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus crispatus* on the adhesion of seven common lower genital tract infection-causing pathogens to vaginal epithelial cells. *Front. Med. (Lausanne)*. 2020; 7: 284. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00284>
- REFERENCES
1. Turrone S., Magnani M., Kc P., Lesnik P., Vidal H., Heer M. Gut microbiome and space travelers' health: state of the art and possible pro/prebiotic strategies for long-term space missions. *Front. Physiol.* 2020; 11: 553929. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.553929>
 2. Kira E.F. *Bacterial vaginosis (clinic, diagnosis, treatment)*: Diss. St. Petersburg; 1995. (in Russian)
 3. Toniyan K.A., Aryutin D.G., Belousova A.A. Reproductive health of women after surgical treatment of acute purulent inflammatory diseases of uterine appendages. *Mat' i ditya v Kuzbasse*. 2018; (4): 37–43. (in Russian)
 4. Tomilovskaya E., Shigueva T., Sayenko D., Rukavishnikov I., Kozlovskaya I. Dry immersion as a ground-based model of microgravity physiological effects. *Front. Physiol.* 2019; 10: 284. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00284>
 5. Ankirskaya A.S., Murav'eva V.V. Integral assessment of the condition of the vaginal microbiota. diagnosis of opportunistic vaginitis. *Akusherstvo i ginekologiya: novosti, mneniya, obuchenie*. 2020; 8(1): 69–76. <https://doi.org/10.24411/2303-9698-2020-11009> (in Russian)
 6. Kulaichev A.P. *Methods and Means of Complex Statistical Data Analysis: Textbook [Metody i sredstva kompleksnogo statisticheskogo analiza dannykh: Uchebnoe posobie]*. Moscow: INFRA-M; 2017. (in Russian)
 7. Savicheva A.M., Tapil'skaya N.I., Shipitsyna E.V., Vorob'eva N.E. Bacterial vaginosis and aerobic vaginitis as major vaginal microflora balance disorders: diagnostic and therapeutic characteristics. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2017; (5): 24–31. <https://doi.org/10.18565/aig.2017.5.24-31> (in Russian)
 8. Melkumyan A.R. *Innovative methods of species identification of lactobacilli in assessing the state of the vaginal microbiota in pregnant women*: Diss. Moscow; 2013. (in Russian)
 9. Gladysheva I., Cherkasov S. Corynebacterium species in the female genital tract – pathogens or potential probiotics. *Int. J. Pharma Bio Sci.* 2018, 9(4): 265–72. <https://doi.org/10.22376/ijpbs.2018.9.4.b265-272>
 10. Hütt P., Lapp E., Štšepetova J., Smidt I., Taelma H., Borovkova N., et al. Characterisation of probiotic properties in human vaginal lactobacilli strains. *Microb. Ecol. Health Dis.* 2016; 27: 30484. <https://doi.org/10.3402/mehd.v27.30484>
 11. He Y., Niu X., Wang B., Na R., Xiao B., Yang H. Evaluation of the inhibitory effects of *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus crispatus* on the adhesion of seven common lower genital tract infection-causing pathogens to vaginal epithelial cells. *Front. Med. (Lausanne)*. 2020; 7: 284. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00284>

Информация об авторах

Ильин Вячеслав Константинович — д.м.н., проф., зав. отделом санитарно-гигиенической безопасности человека в искусственной среде обитания ИМБП РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3896-5003>

Бояринцев Валерий Владимирович — д.м.н., проф., зав. кафедрой скорой медицинской помощи, неотложной и экстремальной медицины, ЦГМА УДП РФ, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9707-3262>

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

Тониан Константин Александрович — зав. отделением, врач акушер-гинеколог отделения гинекологии Клинической больницы № 1 (Волынская) УДП РФ, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9304-5694>

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

Морозова Юлия Алексеевна — н.с., лаб. микробной экологии человека ИМБП РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9461-6986>

Муравьева Вера Васильевна — к.б.н., с.н.с. лаб. микробиологии НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0383-0731>

Байрамова Гюльдана Рауфовна — д.м.н., зав. по клинической работе научно-поликлинического отделения НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4826-661X>

Припутневич Татьяна Валерьевна — д.м.н., директор Института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии, НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4126-9730>

Information about the authors

Vyacheslav K. Ilyin — D. Sci. (Med.), Prof., Head, Department of sanitary and hygienic safety of a person in an artificial environment, Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3896-5003>

Valery V. Boyarintsev — D. Sci. (Med.), Prof., Head, Department of emergency and extreme medicine, Central State Medical Academy of the Presidential Administration of the Russian Federation, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9707-3262>

Darya V. Komissarova[✉] — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of nutrition, water supply, gastroenterology and hygiene control of physical factors of the environment, Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, d.komisarova@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6374-4515>

Konstantin A. Toniyan — Head of Department, obstetrician-gynecologist, Department of gynecology, Clinical Hospital No. 1 (Volynskaya) of the Presidential Administration of the Russian Federation, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9304-5694>

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

Yuliya A. Morozova — researcher, Laboratory of human microbial ecology, Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9461-6986>

Vera V. Muravieva — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of molecular microbiology, Department of molecular microbiology and bioinformatics, Institute of Microbiology, Antimicrobial Therapy and Epidemiology, Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0383-0731>

Gyuldana R. Bayramova — D. Sci. (Med.), Prof., Department of obstetrics and gynecology, Department of professional education, Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4826-661X>

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 19.07.2021;
принята к публикации 30.09.2021;
опубликована 25.10.2021

Tatyana V. Priputnevich — D. Sci. (Med.), Director, Institute of Microbiology, Antimicrobial Therapy and Epidemiology, Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4126-9730>

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 19.07.2021;
accepted for publication 30.09.2021;
published 25.10.2021

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-149>

Взаимодействие возбудителей сапронозов с клетками наземного растения воробейника краснокорневого

Тимченко Н.Ф.¹, Елисейкина М.Г.², Чернодед Г.К.³, Грищенко О.В.³,
Раков А.В.¹, Щелканов М.Ю.^{1,2}

¹Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, Владивосток, Россия;

²Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия;

³Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия

Аннотация

Введение. Существенную роль в экологии возбудителей сапронозов *Yersinia pseudotuberculosis* и *Listeria monocytogenes* и в эпидемиологии вызываемых ими инфекций играют наземные растения, употребляемые в пищу. Эти микроорганизмы часто обнаруживаются на растительных субстратах, они размножаются на разных овощных культурах и корнеплодах. В связи с этим актуально изучение жизнеспособности и биологической активности *Y. pseudotuberculosis* и *L. monocytogenes* при контакте с разными наземными растениями, в том числе с теми, которые не употребляются в пищу, но используются для лечения.

Цель исследования — изучение взаимодействия возбудителей сапронозов *Y. pseudotuberculosis* и *L. monocytogenes* с каллусными культурами наземного растения воробейника краснокорневого (*Lithospermum erythrorhizon* Siebold et Zucc).

Материалы и методы. В исследование включены штаммы бактерий *Y. pseudotuberculosis* 512 1b серотипа, рYV+, 82MD+ и *L. monocytogenes* NCTC (4b) 10527 из коллекции НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, а также культура клеток из корней воробейника краснокорневого, линия ВК-39 (Коллекция ФНЦ биоразнообразия ДВО РАН).

Перед исследованиями *Y. pseudotuberculosis* и *L. monocytogenes* культивировали на питательном агаре при pH 7,1–7,2 в течение 18–20 ч. Готовили рабочее разведение микроорганизмов (10⁶ микробных клеток на 1 мл) и наносили их в дозе 100 мкл на поверхность каллусов растений. В динамике через 3 и 14 сут брали пробы материала и готовили их для сканирующей электронной микроскопии.

Результаты. Уже в течение 3–14 сут после начала эксперимента *Y. pseudotuberculosis* и *L. monocytogenes* образовывали биоплёнки на поверхности клеток исследуемых растений. При этом впервые обнаружено, что *Y. pseudotuberculosis* разрушали компоненты оболочки клеток.

Заключение. Новые данные, полученные при исследовании, расширяют представления о средах и формах обитания, а также потенциале патогенности возбудителей сапронозов в окружающей среде.

Ключевые слова: бактерии, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Lithospermum erythrorhizon*, биоплёнка

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: Тимченко Н.Ф., Елисейкина М.Г., Чернодед Г.К., Грищенко О.В., Раков А.В., Щелканов М.Ю. Взаимодействие возбудителей сапронозов с клетками наземного растения воробейника краснокорневого. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(6):664–670.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-149>

Interaction of causative agents of sapronoses with the land plant *Lithospermum erythrorhizon*

Nelly F. Timchenko^{1✉}, Marina G. Eliseikina², Galina K. Tchernoded³,
Olga V. Grishchenko³, Alexey V. Rakov¹, Mikhail Yu. Shchelkanov^{1,2}

¹Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia;

²A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia;

³Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

Abstract

Background. A significant role in the ecology of the sapronotic pathogens *Yersinia pseudotuberculosis* and *Listeria monocytogenes* and in the epidemiology of the infections they cause is played by land plants used for food. These microorganisms are often found on plant substrates, they multiply on various vegetable and root crops. In this regard, it is relevant to study the viability and biological activity of *Y. pseudotuberculosis* and *L. monocytogenes* in contact with various land plants, including those that are not eaten, but are used in medicine.

Aim. Study of the interaction of sapronotic pathogens *Y. pseudotuberculosis* and *L. monocytogenes* with callus cultures of the land plant *Lithospermum erythrorhizon* Siebold et Zucc.

Materials and methods. The studies included strains of *Y. pseudotuberculosis* 512 serotype 1b, pYV+, 82MD+ and *L. monocytogenes* NCTC (4b) 10527 from the Collection of Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, and cell culture from the roots of red-root gromwell *Lithospermum erythrorhizon* line VC-39 (from the Collection of FSC of the East Asia Terrestrial Biodiversity FEB RAS).

Before the study, *Y. pseudotuberculosis* and *L. monocytogenes* were cultured 18–20 hours on nutrient agar pH 7.1–7.2. A working dilution of microorganisms was prepared (10^6 microbial cells per 1 ml) and applied at a dose of 100 μ l to the surface of plant calli. Material samples were taken in dynamics after 3 and 14 days and prepared for scanning electron microscopy.

Results. *Y. pseudotuberculosis* and *L. monocytogenes* formed biofilms on the surface of plant cells within 3 days after the start of the experiment. It was noted that *Y. pseudotuberculosis* destroyed the components of the plant cell membrane.

Conclusion. New data obtained during the study expand the understanding of environments and forms of habitation, as well as the potential for pathogenicity of sapronotic pathogens in the environment.

Keywords: bacteria, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Lithospermum erythrorhizon*, biofilm

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: Timchenko N.F., Eliseikina M.G., Tchernoded G.K., Grishchenko O.V., Rakov A.V., Shchelkanov M.Yu. Interaction of causative agents of sapronoses with the land plant *Lithospermum erythrorhizon*. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(6):664–670. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-149>

Введение

К настоящему времени имеются данные о способности возбудителей сапронозов [1], в частности *Yersinia pseudotuberculosis* [2], *Listeria monocytogenes* [3], а также зоонозов [4] использовать разные среды обитания. Значительную роль в экологии этих микроорганизмов и в эпидемиологии вызываемых ими инфекций играют растения [5, 6]. Анализ многочисленных вспышек, вызванных *Y. pseudotuberculosis* [7] и *Y. enterocolitica* [8], показал, что чаще всего факторами передачи этих бактерий человеку являются овощи и корнеплоды, а также блюда, приготовленные из них, в которых они размножа-

ются и накапливаются в значительных количествах, поддерживая высокую степень вирулентности.

Имеются сведения о том, что сок многих овощей, например, моркови, свёклы, капусты, содержит аттрактанты для *Y. pseudotuberculosis* [9]. На этом основании авторами сделано предположение о роли хемотаксиса названных бактерий при обсеменении ими овощей. В экспериментах с помощью сканирующей электронной микроскопии выявлено, что *Yersinia* и некоторые другие энтеробактерии формируют микроколонии на поверхности кусочков корма, яичной скорлупы, листьев капусты [10]. Также выявлена способность этих бактерий форми-

ровать биоплёнки на поверхности каллусов женьшеня — *Panax ginseng* С.А. Мей штамм R-1 [11]. Исследования в этом направлении своевременны и актуальны.

В представленной статье основное внимание сосредоточено на изучении взаимодействия бактерий — возбудителей сапронозов — с каллусами наземного растения воробейника краснокорневого (*Lithospermum erythrorhizon*) — ВК. Это травянистое многолетнее растение распространено на Дальнем Востоке России, в Приморье, Приамурье, а также в Китае, Монголии, Японии и Корее. В лечебных целях применяются его корни, листья и плоды.

Основными биоактивными метаболитами в корнях ВК являются шиконин и его производные [12, 13]. Согласно многочисленным исследованиям, шиконин эффективен при воспалениях, лечении ран, а также есть сведения о его выраженном противораковом эффекте в отношении различных типов опухолей вследствие ингибирования пролиферации клеток и их миграций, индукции апоптоза, автофагии, некроза и значимом антиоксидантном действии [14, 15].

Известно о противогрибковом [16] и противовирусном [17] действии экстрактов из ВК. Культура клеток из корней ВК-39 продуцирует эфиры шиконина, на основе которых производят шикониновое масло. Оно эффективно ингибирует грамположительную микрофлору (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. lutea*, *Bacillus subtilis* и др.), обладает противогрибковым действием, является эффективным нестероидным противовоспалительным препаратом, т.к. нормализует продукцию ключевых медиаторов воспаления — интерлейкинов-1 и -2, γ -интерферона, снижает отёк и сосудистую проницаемость в очаге острого воспаления. Антимикробное и противовоспалительное действие этого средства сочетается с его способностью регенерировать эпителий после различных поражений.

Имеющиеся данные свидетельствуют об актуальности исследований в этом направлении для расширения и углубления познания механизмов, используемых патогенными для человека и животных бактериями — возбудителями сапронозов — при обитании их в разных средах, в частности, клетках наземных растений, а также создания на этой основе новых диагностических и лечебных препаратов [18–21].

Цель исследования: изучение взаимодействия возбудителей сапронозов *Y. pseudotuberculosis* и *L. monocytogenes* с каллусными культурами ВК.

Материалы и методы

В работе использованы штаммы бактерий *Y. pseudotuberculosis* 512 1b серотипа, pYV+, 82MD+ и *L. monocytogenes* NCTC (4b) 10527, изо-

лированные от больных (Коллекция НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова) и культура клеток из корней ВК, линия ВК-39 (Коллекция ФНЦ биоразнообразия ДВО РАН).

Перед исследованиями *Y. pseudotuberculosis* и *L. monocytogenes* культивировали на питательном агаре при pH 7,1–7,2 в течение 18–20 ч. Готовили рабочее разведение микроорганизмов (10^6 микробных клеток на 1 мл) и наносили их на поверхность каллусов растений в дозе 100 мкл. В динамике через 3 и 14 сут брали пробы материала и готовили их для сканирующей электронной микроскопии.

Каллусы ВК культивировали на агаризованной питательной среде W0, содержащей дополнительно 2 мг/л кинетина, 0,2 мг/л индол-3-уксусной кислоты и 0,25 мг/л CuSO_4 , в пробирках в темноте при $25 \pm 1^\circ\text{C}$ [14]. Через 30 сут каллусы переносили на свежую аналогичную питательную среду, затем через неделю добавляли исследуемые бактерии. Начальная масса каллусов составила 0,20–0,22 г. Условия культивирования не меняли до конца эксперимента.

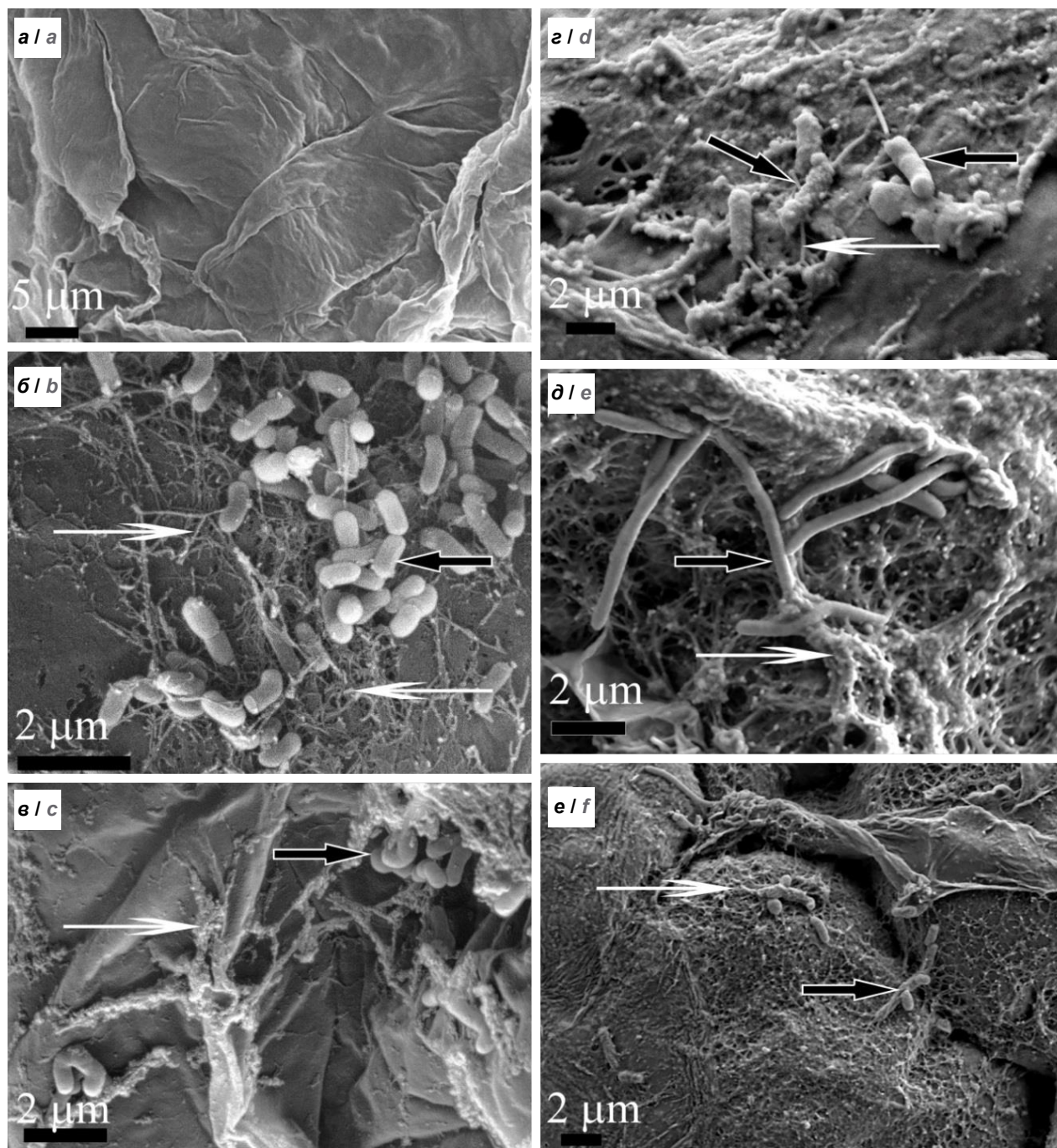
В динамике через 3 и 14 сут после добавления бактерий брали пробы материала для сканирующей электронной микроскопии. Образцы фиксировали в 2,5% глутаровом альдегиде, приготовленном на 0,1 М какодилатном буфере pH 7,2 в течение 24 ч. Промывали пробы в том же буфере в течение 24 ч. Затем дополнительно фиксировали их в 1% OsO_4 , приготовленном на дистиллированной воде (20 мин), и промывали в дистиллированной воде в течение 5 ч. Пробы обезвоживали с использованием установки «BAL-TEC CPD 030» («Bal-Тес»), закрепляли на столиках для сканирующей электронной микроскопии, используя двустороннюю ленту, и напыляли хромом толщиной 10–15 нм («Q150 TES», «Quorum Technologies»). Приготовленные препараты анализировали с использованием сканирующего электронного микроскопа «Evo40» («Carl Zeiss»). Разгонное напряжение составило 29 кВ.

Результаты

С помощью сканирующей электронной микроскопии исследован характер взаимодействия возбудителей сапронозов *Y. pseudotuberculosis* и *L. monocytogenes* с каллусными культурами ВК.

В контроле клетки культуры на протяжении всего периода наблюдения (14 сут) имели целостную поверхность без признаков разрушения (рисунк, а).

Через 3 сут после заражения клеток ВК *Y. pseudotuberculosis* на поверхности растительных клеток бактерии формировали биоплёнку, состоящую из палочек длиной до 2,5 мкм, объединённых длинными контактными отростками (рисунок, з, д). Часть микроорганизмов имела неровную поверхность, что отражало начальный этап их фрагментации в ходе формирования бесструктурного матрикса — ком-



Сканирующая электронная микроскопия возбудителей сапронозов *Y. pseudotuberculosis* и *L. monocytogenes* при взаимодействии с каллусными культурами ВК.

a — стерильная культура клеток ВК, контрольный образец (14-е сутки после начала эксперимента); *b* — формирование биоплёнки *L. monocytogenes* на поверхности клеток культуры (3-и сутки), бактериальные клетки (черная стрелка) объединены сетью контактных отростков (белые стрелки); *c* — *L. monocytogenes* (черная стрелка) погружены в бесструктурный матрикс (белая стрелка), покрывающий поверхность растительных клеток (14-е сутки); *d* — биоплёнка, образованная *Y. pseudotuberculosis* на поверхности растительных клеток (3-и сутки), бактерии (чёрные стрелки) объединены контактными отростками (белая стрелка); *e* — биоплёнка *Y. pseudotuberculosis* (чёрные стрелки) на поверхности растительных клеток (14-е сутки), бактериальные клетки погружены в аморфный матрикс (белые стрелки).

Scanning electron microscopy of the causative agents of sapronosis *Y. pseudotuberculosis* and *L. monocytogenes* in interaction with callus cultures of the *Lithospermum erythrorhizon*.

a — sterile culture of *L. erythrorhizon* cells, control sample (14 days) after the start of the experiment; *b* — formation of *L. monocytogenes* biofilm on the surface of cultured cells (3 days), bacterial cells (black arrow) are united by a network of contact projections (white arrows); *c* — *L. monocytogenes* (black arrow) immersed in a structureless matrix (white arrow) covering the surface of plant cells (14 days); *d* — biofilm formed by *Y. pseudotuberculosis* on the surface of *L. erythrorhizon* cultured cells, the third day after the start of the experiment; bacteria (black arrows) are united by contact projections (white arrow); *e*, *f* — biofilm of *Y. pseudotuberculosis* (black arrows) on the surface of *L. erythrorhizon* cells (14 days), bacterial cells are immersed in an amorphous matrix (white arrows).

понтента биоплёнки. Через 14 сут после начала эксперимента зрелая биоплёнка покрывала большую часть поверхности клеток ВК. Под действием бактерий нарушалась целостность оболочек растительных клеток, в результате чего обнажалась сеть полисахаридных волокон, входящих в состав клеточных стенок. Бактериальная биоплёнка была представлена бесструктурным матриксом и погружёнными в него бактериальными клетками (рисунок, д), длина некоторых экземпляров достигала 8 мкм.

На 3-и сутки после внесения *L. monocytogenes* в культуру клеток ВК на поверхности растений имелись участки, покрытые формирующейся бактериальной биоплёнкой (рисунок, б). Группы коротких (длиной около 1 мкм) палочек были соединены длинными контактными отростками, формирующими сетчатые структуры на поверхности клеток ВК. На 14-е сутки после заражения поверхность растительных клеток покрывала зрелая биоплёнка, состоящая из тяжёлой бесструктурной матрикса и бактериальных клеток (рисунок, в). При этом поверхность растительных клеток выглядела целостной, без признаков разрушения.

Обсуждение

В настоящее время активно развиваются исследования, касающиеся мест и форм обитания возбудителей инфекционных заболеваний, их жизнеспособности, биологической активности и вирулентности. Известно, что *Y. pseudotuberculosis* и *L. monocytogenes* относятся к возбудителям сапронозов. Названные микроорганизмы обнаружены в разных наземных объектах, в том числе в растениях, употребляемых в пищу. Имеющиеся данные о важной роли растений в развитии патологии человека и животных не вызывают сомнений и требуют дальнейшего изучения.

Основными результатами проведённого исследования являются следующие:

1. Получены новые данные о способности возбудителей сапронозов *Y. pseudotuberculosis* и *L. monocytogenes* длительный период времени обитать на клетках ВК, не употребляемого в пищу, но используемого для получения лечебных и профилактических препаратов.

2. Установлено, что *Y. pseudotuberculosis* и *L. monocytogenes* образовывали биоплёнки на поверхности каллусов ВК.

3. Обнаружено, что *Y. pseudotuberculosis*, в отличие от *L. monocytogenes*, разрушали компоненты оболочки растительных клеток, что, очевидно, может способствовать проникновению бактерий внутрь этих клеток.

Заключение

Новые сведения о жизнеспособности возбудителей сапронозов в наземных растениях, применя-

емых, в частности, для лечения, расширяют представление о биологической активности этих микроорганизмов и требуют дальнейших исследований.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Терских В.И. Сапронозы (о болезнях людей и животных, вызываемых микробами, способными размножаться вне организма во внешней среде, являющейся для них местом обитания). *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1958; 35(8): 118–20.
2. Сомов Г.П. Еще раз о сапронозах. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1985; 62(5): 98–104.
3. Тимченко Н.Ф., Недашковская Е.П., Долматова Л.С., Сомова-Исачкова Л.М. *Токсины Yersinia pseudotuberculosis*. Владивосток; 2004.
4. Erickson M.C., Jue-Yin L., Payton A.S., Cook P.W., Baker H.C.D., Bautista J., et al. Survival of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 Sprayed onto the Foliage of Field-grown cabbage plant. *J. Food Prot.* 2019; 82(3): 479–85. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-326>
5. Пушкарева В.И., Ермолаева С.А. Экспериментальное обоснование роли растений в эпидемиологии сапронозных инфекций. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2018; 95(5): 113–21. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-5-113-121>
6. Пушкарева В.И. Бактериальные патогены: миграция от их естественных резервуаров человеку. *Успехи современной биологии*. 2019; 139(5): 457–65. <https://doi.org/10.1134/S0042132419040070>
7. Nuorti J.P., Niskanen T., Hallanvuo S., Mikkola J., Kela E., Hatakka M., et al. A widespread outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis* O3 infection from iceberg lettuce. *J. Infect. Dis.* 2004; 189(5): 766–74. <https://doi.org/10.1086/381766>
8. Espenhain L., Riess M., Müller L., Colombe S., Ethelberg S., Litrup E., et al. Cross-border outbreak of *Yersinia enterocolitica* O3 associated with imported fresh spinach, Sweden and Denmark, March 2019. *Euro Surveill.* 2019; 24(24): 1900368. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.1900368>
9. Венедиктов В.С., Тимченко Н.Ф., Антоненко Ф.Ф., Степаненко В.И. Хемотаксис *Yersinia pseudotuberculosis* как механизм поиска тканевых мишеней организма хозяина. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1988; 65(5): 77–81.
10. Павлова И.Б., Ленченко Е.М. Электронно-микроскопическое исследование патогенных бактерий на объектах внешней среды. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1998; 55(5): 13–7.
11. Тимченко Н.Ф., Елисейкина М.Г., Чернодод Г.К., Грищенко О.В., Булгаков В.П. Взаимодействия *Yersinia pseudotuberculosis* с каллусами *Panax ginseng* C.A. Mey. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2019; (3): 4–7. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3559604>
12. Yaron S., Römling V. Biofilm formation by enteric pathogens and its role in plant colonization and persistence. *Microb. Biotechnol.* 2014; 7(6): 496–516. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12186>
13. Найда Н.М., Опалихина В.А. Морфобиологические особенности воробейника краснокорневого в условиях Ленинградской области. *Вестник студенческого научного общества*. 2018; 9(1): 63–4.
14. Журавлев Ю.Н., Булгаков В.П., Писецкая Н.Ф., Козыренко М.М., Старун Т.В., Артюков А.А. и др. Штамм культивируемых клеток растений *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc — продуцент шиконина. Патент РФ №1707073; 1992.
15. Bulgakov V.P., Kozurenko M.M., Fedoreyev S.A., Mischenko N.P., Denisenko V.A., Zvereva L.V., et al. Shikonin production by p-fluorophenylalanine resistant cells of *Litho-*

- spermum erythrorhizon*. *Fitoterapia*. 2001; 72(4): 394–401. [https://doi.org/10.1016/s0367-326x\(00\)00343-9](https://doi.org/10.1016/s0367-326x(00)00343-9)
16. Булгаков В.П., Федорев С.А., Журавлев Ю.Н. Биотехнология – здоровью человека: научные достижения и первые шаги инноваций на Дальнем Востоке. *Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук*. 2004; (3): 93–8.
 17. Guo C., He J., Song X., Wang M., Jiang P., Li Y., et al. Pharmacological properties and derivatives of shikonin — A review in recent years. *Pharmacol. Res.* 2019; 149: 104463. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104463>
 18. Таран Л.М., Слободенюк Е.В., Башаров А.Я. Фармакологические свойства шиконина и его производных. *Дальневосточный медицинский журнал*. 2015; (1): 98–103.
 19. Sasaki K., Yoshiaki F., Abe H. The anti-candida activity of shikonin. *Yakugaki Zasshi. J. Pharm. Soc. Japan*. 2000; 120(6): 587–9. https://doi.org/10.1248/yakushi1947.120.6_587
 20. Yan Y., Tan F., Miao H., Wang H., Cao Y. Effect of shikonin against *Candida albicans* biofilms. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 1085. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01085>
 21. Zhang Y., Han H., Sun L., Qiu H., Lin H., Yu L., et al. Antiviral activity of shikonin ester derivative PPM-034 against enterovirus 71 *in vitro*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2017; 50(10): e6586. <https://doi.org/10.1590/414-431X20176586>
- REFERENCES
1. Terskikh V.I. Sapronoses (on diseases of humans and animals caused by microbes that can multiply outside the body in the external environment, which is their habitat). *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 1958; 35(8): 118–20. (in Russian)
 2. Somov G.P. Once again about sapronoses. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 1985; 62(5): 98–104. (in Russian)
 3. Timchenko N.F., Nedashkovskaya E.P., Dolmatova L.S., Somova-Isachkova L.M. *Toxins of Yersinia pseudotuberculosis [Toksiny Yersinia pseudotuberculosis]*. Vladivostok; 2004. (in Russian)
 4. Erickson M.C., Jue-Yin L., Payton A.S., Cook P.W., Baker H.C.D., Bautista J., et al. Survival of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 Sprayed onto the Foliage of Field-grown cabbage plant. *J. Food Prot.* 2019; 82(3): 479–85. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-326>
 5. Pushkareva V.I., Ermolaeva S.A. Experimental evidences on a crop plant role in epidemiology of sapronotic (soil-borne) bacterial infections. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2018; 95(5): 113–21. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-5-113-121> (in Russian)
 6. Pushkareva V.I. Bacterial pathogens: migration from their natural reservoirs to humans. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2019; 139(5): 457–65. <https://doi.org/10.1134/S0042132419040070> (in Russian)
 7. Nuorti J.P., Niskanen T., Hallanvuoto S., Mikkola J., Kela E., Hatakka M., et al. A widespread outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis* O3 infection from iceberg lettuce. *J. Infect. Dis.* 2004; 189(5): 766–74. <https://doi.org/10.1086/381766>
 8. Espenhain L., Riess M., Müller L., Colombe S., Ethelberg S., Litrup E., et al. Cross-border outbreak of *Yersinia enterocolitica* O3 associated with imported fresh spinach, Sweden and Denmark, March 2019. *Euro Surveill.* 2019; 24(24): 1900368. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.24.1900368>
 9. Venediktov V.S., Timchenko N.F., Antonenko F.F., Stepanenko V.I. Chemotaxis of *Yersinia pseudotuberculosis* as a mechanism for searching for tissue targets of the host organism. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 1988; 65(5): 77–81. (in Russian)
 10. Pavlova I.B., Lenchenko E.M. Electron microscopic examination of pathogenic bacteria on environmental objects. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 1998; 55(5): 13–7. (in Russian)
 11. Timchenko N.F., Eliseykina M.G., Chernoded G.K., Grishchenko O.V., Bulgakov V.P. Interaction of *Yersinia pseudotuberculosis* with calluses *Panax ginseng* C.A. Mey. *Zdorov'e. Meditsinskaya ekologiya. Nauka*. 2019; (3): 4–7. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3559604> (in Russian)
 12. Yaron S., Römling V. Biofilm formation by enteric pathogens and its role in plant colonization and persistence. *Microb. Biotechnol.* 2014; 7(6): 496–516. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12186>
 13. Nayda N.M., Opalikhina V.A. Morphobiological features of the red-corn sparrow in the conditions of the Leningrad region. *Vestnik studencheskogo nauchnogo obshchestva*. 2018; 9(1): 63–4. (in Russian)
 14. Zhuravlev Yu.N., Bulgakov V.P., Pisetskaya N.F., Kozyrenko M.M., Starun T.V., Artyukov A.A., et al. Plant cultured cell strain *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc — Shiconin product. Patent RF №1707073; 1992. (in Russian)
 15. Bulgakov V.P., Kozyrenko M.M., Fedoreyev S.A., Mischenko N.P., Denisenko V.A., Zvereva L.V., et al. Shikonin production by p-fluorophenylalanine resistant cells of *Lithospermum erythrorhizon*. *Fitoterapia*. 2001; 72(4): 394–401. [https://doi.org/10.1016/s0367-326x\(00\)00343-9](https://doi.org/10.1016/s0367-326x(00)00343-9)
 16. Bulgakov V.P., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Yu.N. Biotechnology for the human health: the scientific advances and the first innovation steps in the Far East. *Vestnik Dal'nevostochnogo otdeleniya Rossiyskoy akademii nauk*. 2004; (3): 93–8. (in Russian)
 17. Guo C., He J., Song X., Wang M., Jiang P., Li Y., et al. Pharmacological properties and derivatives of shikonin — A review in recent years. *Pharmacol. Res.* 2019; 149: 104463. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104463>
 18. Taran L.M., Slobodenyuk E.V., Basharov A.Ya. Pharmacological properties of shikonin and its derivatives. *Dal'nevostochnyy meditsinskiy zhurnal*. 2015; (1): 98–103. (in Russian)
 19. Sasaki K., Yoshiaki F., Abe H. The anti-candida activity of shikonin. *Yakugaki Zasshi. J. Pharm. Soc. Japan*. 2000; 120(6): 587–9. https://doi.org/10.1248/yakushi1947.120.6_587
 20. Yan Y., Tan F., Miao H., Wang H., Cao Y. Effect of shikonin against *Candida albicans* biofilms. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 1085. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01085>
 21. Zhang Y., Han H., Sun L., Qiu H., Lin H., Yu L., et al. Antiviral activity of shikonin ester derivative PPM-034 against enterovirus 71 *in vitro*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2017; 50(10): e6586. <https://doi.org/10.1590/414-431X20176586>

Информация об авторах

Тимченко Нелли Федоровна[✉] — д.м.н., проф., в.н.с. НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия, ntimch@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6051-292X>

Елисейкина Марина Геннадьевна — к.б.н., с.н.с. Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5361-6261>

Чернодод Галина Кирилловна — н.с. ФНЦ биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, Владивосток, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7570-2881>

Information about the authors

Nelly F. Timchenko[✉] — D. Sci. (Med.), Professor, leading researcher, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia, ntimch@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6051-292X>

Marina G. Eliseykina — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology FEB RAS, Vladivostok, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5361-6261>

Galina K. Tchernoded — researcher, Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity FEB RAS, Vladivostok, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7570-2881>

Грищенко Ольга Вадимовна — н.с. ФНЦ биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, Владивосток, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0123-7195>

Раков Алексей Владимирович — к.м.н., с.н.с. НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1917-9189>

Щелканов Михаил Юрьевич — д.б.н., доцент, директор НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова», Владивосток, Россия; в.н.с. лаб. морских млекопитающих Национального научного центра морской биологии ДВО РАН, Владивосток, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8610-7623>

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 16.05.2021;
принята к публикации 12.08.2021;
опубликована 29.10.2021

Olga V. Grishchenko — researcher, Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity FEB RAS, Vladivostok, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0123-7195>

Alexey V. Rakov — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1917-9189>

Mikhail Yu. Shchelkanov — D. Sci. (Biol.), Associate Professor, director, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia; leading researcher, A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology FEB RAS, Vladivostok, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8610-7623>

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 16.05.2021;
accepted for publication 12.08.2021;
published 29.10.2021



Характеристика вирулентных штаммов *Escherichia coli*, выделенных от пациентов с урологической инфекцией

Слукин П.В.¹, Асташкин Е.И.¹, Асланян Е.М.¹, Ершова М.Г.², Полетаева Е.Д.²,
Светоч Э.А.¹, Шепелин А.П.¹, Фурсова Н.К.¹

¹Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, Оболensk, Россия;

²Инфекционная клиническая больница № 1, Ярославль, Россия

Аннотация

Введение. Инфекции мочевыводящих путей (ИМП), вызванные уropатогенными *Escherichia coli* (UPEC), ежегодно поражают 150 млн человек.

Цель: характеристика внегоспитальных штаммов UPEC, выделенных от пациентов с ИМП в Ярославле в 2016–2017 гг.

Материалы и методы. Чувствительность штаммов UPEC ($n = 20$) к антимикробным препаратам определяли методом серийных разведений; гены антибиотикорезистентности и вирулентности, филогруппы, O-серогруппы и сиквенс-типы идентифицировали методом ПЦР и полногеномного секвенирования. Вирулентность штаммов изучали на модели личинок *Galleria mellonella*.

Результаты. Штаммы UPEC отнесены к категориям лекарственно-резистентных ($n = 11$) и множественно лекарственно-резистентных ($n = 9$) патогенов. Выявлены гены β -лактамаз bla_{TEM} ($n = 10$), bla_{CTX-M} ($n = 6$), интегроны класса 1 ($n = 8$) и генные кассеты $dfrA17-aacA5$ ($n = 2$), $dfrA1$ ($n = 1$) и $aacA4-cmlA1$ ($n = 1$). Идентифицированы гены вирулентности UPEC: адгезинов $fimH$, $papG$, $sfaS$, $focG$, $afa/draBC$, $csgA$, сидерофоров $iroN$, $fyuA$, $iutA$, факторов противодействия иммунитету макроорганизма $ompT$ и $traT$, токсинов $hlyA$, $cnf1$, usp , транспортёра капсулы $kpsMTII$, колицина $svaC$, островов патогенности I₅₃₆, II₅₃₆, III₅₃₆, IV₅₃₆, II_{J96} и II_{CFT073}. Определены высоковирулентные и слабовирулентные для личинок *G. mellonella* штаммы UPEC с LD₅₀ 10^4 – 10^5 и 10^6 – 10^7 КО соответственно. Идентифицированы филогруппы A, B1, B2, E и F, серогруппы O2, O4, O6, O9, O11, O15, O18, O25, O75 и O89, известные сиквенс-типы ST14, ST58, ST69, ST73, ST93, ST127, ST131, ST141, ST165, ST297, ST457, ST537, ST744, ST1434 и впервые найденные в данном исследовании ST9239 и ST10102.

Заключение. Выявленное генетическое разнообразие внегоспитальных штаммов UPEC согласуется с мировой тенденцией распространения патогенов человека, обладающих одновременно высокой вирулентностью и множественной лекарственной устойчивостью. Это позволяет проспективно охарактеризовать текущую эпидемиологическую ситуацию, дать прогноз её развития, а также определить оптимальные направления терапии.

Ключевые слова: UPEC, уropатогенные *Escherichia coli*, гены факторов патогенности, мультилокусное секвенирование-типирование, полногеномное секвенирование, сиквенс-типы, *Galleria mellonella*

Этическое утверждение. В работе использована модель личинок *Galleria mellonella*, которые не подпадают под этические ограничения для моделей на млекопитающих животных. При содержании животных были соблюдены все применимые институциональные принципы ухода.

Источник финансирования. Исследование выполнено в рамках Отраслевой программы Роспотребнадзора.

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

Для цитирования: Слукин П.В., Асташкин Е.И., Асланян Е.М., Ершова М.Г., Полетаева Е.Д., Светоч Э.А., Шепелин А.П., Фурсова Н.К. Характеристика вирулентных штаммов *Escherichia coli*, выделенных от пациентов с урологической инфекцией. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(6):671–684. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-134>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-134>

Characterization of virulent *Escherichia coli* strains isolated from patients with urological infection

Pavel V. Slukin¹, Eugeny I. Astashkin¹, Elena M. Aslanyan¹, Marina G. Ershova², Elena D. Poletaeva², Edward A. Svetoch¹, Anatoly P. Shepelin¹, Nadezhda K. Fursova¹

¹State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia;

²Infectious Clinical Hospital No. 1, Yaroslavl, Russia

Abstract

Objective. Urinary tract infections (UTIs) caused by uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) affect 150 million people annually.

Purpose: Characteristics of non-hospital strains of UPEC isolated from patients with UTI in Yaroslavl in 2016–2017.

Materials and methods. Susceptibility of UPEC strains ($n = 20$) to antibacterials was measured by the serial dilution method; the antibiotic resistance and virulence genes, phylogroups, O-serogroups and sequence types were identified by PCR and whole genome sequencing. The virulence of the strains was studied using the model of *Galleria mellonella* larvae.

Results. UPEC strains were classified as resistant ($n = 11$) and multi-drug resistant ($n = 9$) pathogens. Beta-lactamase genes bla_{TEM} ($n = 10$), bla_{CTX-M} ($n = 6$), class 1 integrons ($n = 8$), and gene cassettes $dfrA17-aadA5$ ($n = 2$), $dfrA1$ ($n = 1$) and $aacA4-cmlA1$ ($n = 1$) were identified. UPEC-virulence genetic determinants coding adhesins $fimH$, $papG$, $sfaS$, $focG$, $afa/draBC$, $csgA$, siderophores $iroN$, $fyuA$, $iutA$, counteracting factors of host immunity $ompT$, $traT$, toxins $hlyA$, $cnf1$, usp , capsule transporter $kpsMTII$, colicin $cvaC$, and pathogenicity islands I_{536'}, II_{536'}, III_{536'}, IV_{536'}, II_{J96} и II_{CFT073} were detected. Highly virulent and slightly virulent for *G. mellonella* larvae UPEC strains were obtained with LD₅₀ 10^4 – 10^5 and 10^6 – 10^7 CFU, respectively. The phylogroups A, B1, B2, E and F, serogroups O2, O4, O6, O9, O11, O15, O18, O25, O75 and O89, known sequence types ST14, ST58, ST69, ST73, ST93, ST127, ST131, ST-141, ST165, ST297, ST457, ST537, ST744, ST1434 and novel ST9239 and ST10102 were revealed.

Conclusions. The identified genetic diversity of non-hospital UPEC strains is consistent with the observed global trend in the spread of human pathogens, which are characterized with both high virulence and multiple drug resistance. This makes possible to assess prospectively the current epidemiological situation, give a forecast for its development in the future, as well as determine the optimal therapeutic options.

Keywords: UPEC, uropathogenic *Escherichia coli*, pathogenic factor genes, multilocus sequence typing, whole genome sequencing, sequence-type, *Galleria mellonella*

Ethics approval. We used a model of *Galleria mellonella* larvae, which are not subject to ethical restrictions for mammalian models. All applicable institutional care guidelines have been observed in the keeping of the animals.

Funding source. The study was done on the frame of the Sectoral Programme of Rospotrebnadzor.

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

For citation: Slukin P.V., Astashkin E.I., Aslanyan E.M., Ershova M.G., Poletaeva E.D., Svetoch E.A., Shepelin A.P., Fursova N.K. Characterization of virulent *Escherichia coli* strains isolated from patients with urological infection. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(6):671–684.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-134>

Введение

Инфекции мочевыводящих путей (ИМП) — широко распространённые бактериальные инфекции, ежегодно поражающие в мире 150 млн человек [1]. Доминирующей возбудитель ИМП — уropathогенные *Escherichia coli* (uropathogenic *Escherichia coli* — UPEC), которые вызывают 90% внегоспитальных и 50% госпитальных урологических инфекций [2]. В России в 2018 г. *E. coli* были ведущим возбудителем ИМП в разных субпопуляциях пациентов — от 71 до 80% [3]. Около 50–60% взрослых женщин имеют хотя бы один эпизод ИМП

в течение жизни [4]. UPEC-инфекции зачастую вызваны множеством резистентными *E. coli*, в частности, глобальным доминирующим клоном UPEC сиквенс-типа ST-131, несущим β-лактамазы расширенного спектра (БЛРС) [5]. У продуцентов БЛРС были идентифицированы гены bla_{CTX-M} (до 100% штаммов), bla_{SHV} (~63%), bla_{TEM} (~11%) [6]. Фенотип множественной резистентности ассоциирован с наличием также генетических детерминант, определяющих устойчивость к аминогликозидам (aac , aad , ant , aph), сульфаниламидам (dfr) и фторхинолонам (мутации в хромосомном гене $gyrA$), а также

наличием интегров класса 1 [7]. К генетическим детерминантам, ассоциированным с проявлением патогенных свойств UPEC, относятся гены адгезинов, токсинов, рецепторов сидерофоров, факторов противодействия иммунной системе макроорганизма, транспортёров капсул 2-й и 3-й групп, колицина V и островов патогенности [6]. В России все штаммы UPEC, выделенные в 2017–2018 гг., несли гены, ответственные за синтез сидерофоров (*irp2*, *iuc*, *iroN*), устойчивость и персистенцию (*ompT*) и факторы адгезии (*fimH*, *iha*) [8].

Штаммы UPEC характеризуются высокой степенью генетической гетерогенности, поэтому важное эпидемиологическое значение имеет молекулярно-генетическая характеристика, позволяющая определить принадлежность штаммов к филогенетическим группам (A, B1, B2, D, E и F), O-группам и сиквенс-типам. Штаммы UPEC, выделенные в разных регионах мира, преимущественно относятся к филогруппам B2 и D, серогруппам O8, O15, O25 и O75, сиквенс-типам ST131, ST69, ST73, ST10, ST127 и ST140 [9–11]. В России описаны штаммы UPEC филогенетических групп A, B1, B2, D, E и F [10, 12] и серогрупп O1, O2, O6, O7, O8, O16, O25 и O75 [13, 14]. Публикации о сиквенс-типах штаммов UPEC, выделенных в России, отсутствуют.

Для определения вирулентности штаммов UPEC в последнее время широко используется хорошо охарактеризованная модель личинок большой восковой моли *Galleria mellonella* [5, 15]. Адекватность использования данной модели обеспечивается наличием у личинок элементов иммунной системы (гемоциты гемолимфы, антимикробные пептиды и факторы опсонизации), аналогичных элементам иммунной системы человека [16]. Наибольшей вирулентностью для личинок *G. mellonella* обладали штаммы UPEC наиболее распространённых в мире генетических линий: ST69, ST73 и ST127, а также серогрупп O2 и O6 [15].

Целью данной работы была характеристика штаммов *E. coli*, выделенных от пациентов с внегоспитальными ИМП в ходе пилотного одноцентрового исследования в Ярославле, в том числе определение фенотипов и генотипов антибиотикорезистентности, идентификация генов вирулентности, оценка уровней вирулентности на модели личинок *G. mellonella*, определение принадлежности к филогенетическим группам, O-серогруппам и сиквенс-типам.

Материалы и методы

Биоэтические требования

Использованные в данном исследовании материалы не содержат персональных данных пациентов. В соответствии с требованиями Биоэтического комитета РФ каждый пациент подписывал инфор-

мированное согласие при поступлении в лечебное учреждение на проведение лабораторных исследований.

Штаммы, условия культивирования и хранения

Штаммы *E. coli* ($n = 20$) выделены из образцов мочи от пациентов урологического отделения Инфекционной клинической больницы № 1 г. Ярославля при поступлении в лечебное учреждение, в рамках пилотного одноцентрового клинического исследования в декабре 2016 г. – январе 2017 г. Культуры *E. coli* выращивали на питательной среде ГРМ 1 (ФБУН ГНЦ ПМБ) в аэробных условиях при 37°C. Хранение культур осуществляли в 20% растворе глицерина при –70°C.

Видовая идентификация

Видовую идентификацию бактерий осуществляли с помощью высевов на дифференциально-диагностические питательные среды «Агар Эндо-ГРМ», «Агар Клигlera-ГРМ», «Железо-глюкозо-лактозный агар с мочевиной» и «Ацетатный агар» (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия), с последующим подтверждением на приборе «MALDI-TOF Biotyper» («Bruker»).

Чувствительность к антимикробным препаратам

Минимальные подавляющие концентрации (МПК) 17 антимикробных препаратов (АМП) 6 функциональных классов: β-лактамов (ампициллин, ампициллин/сульбактам, амоксициллин/клавуланат, цефуроксим, цефотаксим, цефтазидим, азтреонам и меропенем), фторхинолонов (ципрофлоксацин, левофлоксацин и норфлоксацин), аминогликозидов (гентамицин), фосфомицинов (фосфомицин), нитрофуранов (фуразолидон, фурацилин и нитрофурантоин) и полимиксинов (колистин) («Sigma-Aldrich») определяли методом микроразведений в бульоне в соответствии с рекомендациями EUCAST Breakpoint tables v 9.0¹. В качестве стандартного использовали штамм *E. coli* ATCC25922, полученный из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск». Категорию резистентности штамма определяли в соответствии с [17].

Детекция генов антибиотикорезистентности и вирулентности

Гены, кодирующие β-лактамазы *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA-48} и *bla*_{NDM}, а также интегроны классов 1 и 2 выявляли методом ПЦР со специфичными праймерами [18]. Острова патогенности UPEC I₅₃₆, II₅₃₆, III₅₃₆, IV₅₃₆, I₉₆, II₉₆, I_{CFT073} и II_{CFT073} и гены, кодирующие факторы вирулентности UPEC, — фим-

¹ URL: <http://www.eucast.org>

брии типа I *fimH*, Р фимбрии *papGI*, *papGII*, *papGIII*, S фимбрии *sfaS*, F1C фимбрии *focG*, AFA/Dr адгезин *afa/draBC*, основной белок курли волокон *csgA*, гемолизин *hlyA*, цитотоксический некротический фактор *cnfI*, уропатогенный специфический белок *usp*, рецепторы сидерофоров сальмохелина *iroN*, иерсиниабактина *fyuA* и аэробактина *iutA*, протеазу внешней мембраны *ompT*, липопротеин наружной мембраны *traT*, транспортёры капсулы 2-го типа *kpsMTII* и 3-го типа *kpsMTIII*, основной белок колицина V *cvaC* — определяли методом ПЦР со специфичными праймерами [8, 19].

Определение вирулентности штаммов

Уровень вирулентности штаммов *E. coli* определяли на модели личинок *G. mellonella*, как описано в работе [15]. Оценивали количество особей, погибших в результате введения им в гемоцель суспензий бактерий в дозах 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 и 10^9 КОЕ/особь. Все эксперименты проводили в 3 повторностях. Расчёт среднелетальной дозы (LD_{50}) штаммов *E. coli* для личинок проводили согласно методу Кербера в модификации Ашмарина [11]. В опытах использовали личинок *G. mellonella*, полученных из лабораторной культуры, поддерживаемой во ФБУН ГНЦ ПМБ.

Идентификация филогенетических групп

Принадлежность штаммов UPEC к филогенетическим группам *E. coli* A, B1, B2, D, E и F определяли с помощью детекции генов, кодирующих геминовый рецептор внешней мембраны *chuA*, гипотетический протеин *yjaA*, анкирин-повторяющийся белок A *arpA*, триптофансинтетазу α -SU *trpA* и эстеразу TspE4.C2, согласно [21].

Определение серологических O-групп

Серологические O-группы определяли методом ПЦР со специфичными праймерами на гены кластера липополисахаридов *wzx*₀₁, *wzx*₀₄, *wzx*₀₁₆, *wzx*₀₁₈, *wzy*₀₂, *wzy*₀₆, *wzy*₀₁₅, *wzy*₀₂₅, *wzy*₀₇₅, *wzy*₀₁₁, *wzt*₀₉ и *wzt*₀₈₉ [22].

Мультилокусное секвенирование-типирование (МЛСТ)

Сиквенс-типы штаммов *E. coli* определяли с помощью ПЦР-амплификации и секвенирования 7 генов «домашнего хозяйства»: аденилаткиназы *adk*, фумаратгидратазы *fumC*, ДНК-гиразы *gyrB*, изоцитратдегидрогеназы *icd*, малатдегидрогеназы *mdh*, аденил-сукцинатдегидрогеназы *purA* и АТФ/ГТФ-связывающего мотива гена *recA* с последующим определением аллельного профиля на сайте Уорикского университета (Великобритания)² [23].

Секвенирование нуклеотидных последовательностей

Последовательности ПЦР-продуктов секвенировали в ООО «СИНТОЛ» на генетическом анализаторе «ABI Prizm 3130xl» с использованием наборов для секвенирования «BigDye v3.1» и анализировали с помощью программ «Chromas»³ («Technelysium»), «Vector NTI 9» («Life Technologies») и BLAST⁴.

Полногеномное секвенирование

Полногеномное секвенирование штаммов *E. coli* проводили с использованием наборов «Nextera DNA Library Preparation Kit» («Illumina») и «MiSeq Reagent Kits v3» («Illumina») на платформе «Illumina MiSeq» согласно инструкции производителя. Единичные прочтения собирали в контиги с использованием программного обеспечения «SPAdes 3.9.0» [24]. Аннотировали собранные геномы с помощью сервера NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline [25]. Анализ полногеномных последовательностей проводили с использованием инструментов Центра геномной эпидемиологии⁵.

Филогенетический анализ

Филогенетический анализ штаммов *E. coli* проводили с использованием ресурсов NCBI «Blastn» и «Blast Tree View»⁶ на основании сравнения искусственно собранных последовательностей аллельных профилей генов МЛСТ.

Статистический анализ

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью пакета «Microsoft Office 2010» и программы «SPSS Statistica 17.0» («IBM»). Проверку распределения на нормальность осуществляли с помощью критерия Колмогорова–Смирнова, нормальным считалось распределение при двусторонней асимптотической значимости более 0,05. Различия сформированных групп вирулентности подтверждали методом двухвыборочного *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок. Различия считали значимыми при величине коэффициента достоверности $p < 0,01$.

Депонирование нуклеотидных последовательностей в базе данных GenBank

В базе данных GenBank размещены 9 полногеномных последовательностей штаммов UPEC: SERS01000000, SERT01000000, SERU00000000, SERV00000000, JACSYM00000000, SERW01000000, SERX00000000, JACSYL00000000, SERY00000000.

³ URL: <http://technelysium.com.au/wp/chromas>

⁴ URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

⁵ URL: <http://www.genomicepidemiology.org>

⁶ URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast>

² URL: http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/allele_st_search

Результаты

Штаммы

Штаммы *E. coli* выделены от 20 женщин 23–84 лет с урологическими диагнозами: хронический цистит ($n = 12$), инфекция мочевыводящей системы без установленной локализации ($n = 3$), цистит ($n = 2$), мочекаменная болезнь ($n = 2$) и гиперактивный мочевого пузыря ($n = 1$) (табл. 1).

Фенотипы и генотипы антибиотикорезистентности

Охарактеризованные штаммы UPEC отнесены к 2 категориям резистентности к АМП: резистентные ($n = 11$) и множественно резистентные ($n = 9$). Резистентные штаммы были устойчивы к препаратам 1–2-й функциональных групп: β-лактамам и нитрофуранам. Множественно резистентные штаммы были устойчивы к препаратам трех (β-лактамам, фторхинолонам и нитрофуранам), четырех (β-лактамам, фторхинолонам, аминоглико-

зидам и нитрофуранам) и пяти (β-лактамам, фторхинолонам, аминогликозидам, полимиксином и нитрофуранам) функциональных групп. При этом все штаммы были чувствительны к фосфомицину (МПК < 32 мг/л), нитрофурантоину (МПК < 64 мг/л) и меропенему (МПК < 0,5 мг/л).

В изучаемых штаммах UPEC выявлены гены β-лактамаз bla_{TEM} ($n = 10$), bla_{CTX-M} ($n = 6$), интегразы класса 1 ($n = 8$) и генные кассеты интегронов класса 1 $dfrA17-aadA5$ ($n = 2$), $dfrA1$ ($n = 1$) и $aacA4-cmlA1$ ($n = 1$). Генов bla_{SHV} , bla_{KPC} , bla_{OXA-48} и bla_{NDM} не обнаружено. Шесть штаммов не имели детектируемых генов антибиотикорезистентности. Выявлено 5 вариантов сочетаний генетических детерминант резистентности: 1 ген bla_{TEM} определен у 4 штаммов, 1 ген bla_{CTX-M} — у 2, сочетание 2 генов $bla_{TEM}+intl1$ — у 3, 2 генов $bla_{CTX-M}+intl1$ — у 2, набор из 3 генов $bla_{TEM}+bla_{CTX-M}+intl1$ — у 3 штаммов. Генные кассеты интегронов несли детерминанты устойчивости к аминогликозидам $aadA5$ и $aacA4$, сульфаниламидам

Таблица 1. Клинические данные и резистентность к АМП штаммов *E. coli*

Table 1. Clinical data and antibacterial resistance of *E. coli* strains

Штамм <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> strain	Дата выделения Strain isolation date	Возраст пациента, лет Patient's age, years	Диагноз Diagnosis	Фенотип резистентности Resistance phenotype	Категория резистентности Resistance category	Гены антибиотикорезистентности Antibiotic resistance genes
U18	14.12.2016	49	ХЦ / CC	BL QNL AMI NIT	MDR	bla_{TEM}
U10	13.12.2016	72	МКБ / UL	BL QNL AMI NIT POL	MDR	bla_{TEM} , bla_{CTX-M} , $intl1$
U22	22.12.2016	63	ХЦ / CC	BL QNL AMI NIT POL	MDR	bla_{TEM} , bla_{CTX-M} , $intl1$
U8	23.12.2016	74	ХЦ / CC	BL NIT	R	—
U9	23.12.2016	67	ИМВС / UINL	BL NIT	R	bla_{CTX-M}
U15	09.01.2017	54	ХЦ / CC	BL NIT	R	—
U14	09.01.2017	61	ХЦ / CC	BL NIT	R	bla_{TEM} , $intl1$
U24	19.12.2016	66	ХЦ / CC	BL QNL NIT	MDR	bla_{TEM} , $intl1$ ($dfrA17-aadA5$)
U13	21.12.2016	77	ХЦ / CC	BL QNL NIT	MDR	bla_{TEM}
U17	19.12.2016	74	ГАМП / OB	BL NIT	R	bla_{TEM}
U23	21.12.2016	38	ХЦ / CC	NIT	R	—
U26	26.12.2016	76	МКБ / UL	BL QNL NIT	MDR	bla_{TEM} , bla_{CTX-M} , $intl1$
U25	23.12.2016	23	ХЦ / CC	NIT	R	—
U11	21.12.2016	84	ХЦ / CC	BL QNL NIT	MDR	bla_{CTX-M} , $intl1$
U12	14.12.2016	27	Ц / C	BL QNL AMI NIT	MDR	bla_{CTX-M}
U20	14.12.2016	26	Ц / C	BL NIT	R	bla_{TEM}
U28	26.12.2016	76	ИМВС / UINL	BL QNL NIT	MDR	bla_{CTX-M} , $intl1$ ($aacA4-cmlA1$, $dfrA17-aadA5$)
U16	14.12.2016	79	ХЦ / CC	BL NIT	R	bla_{TEM} , $intl1$ ($dfrA1$)
U19	29.12.2016	53	ХЦ / CC	NIT	R	—
U21	09.01.2017	24	ИМВС / UINL	BL NIT	R	—

Примечание. ХЦ — хронический цистит; МКБ — мочекаменная болезнь; ИМВС — инфекция мочевыводящей системы без установленной локализации; ГАМП — гиперактивный мочевого пузыря; Ц — цистит; BL — бета-лактамы; QNL — хинолоны; AMI — аминогликозиды; NIT — нитрофураны; POL — полимиксины; R — резистентный штамм; MDR — множественно резистентный штамм.

Note. CC — chronic cystitis; UL — urolithiasis; UINL — urinary tract infection with no known localization; OB — overactive bladder; C — cystitis; BL — beta-lactams; QNL — quinolones; AMI — aminoglycosides; NIT — nitrofurans; POL — polymyxins; R — resistant strain; MDR — multiply resistant strain.

dfrA1 и *dfrA17*, хлорамфениколу *cmIA1*. У 5 интегровых генные кассеты отсутствовали (табл. 1).

Генотипы вирулентности штаммов UPEC

В изучаемых штаммах *E. coli* выявлены гены факторов вирулентности UPEC 7 функциональных групп: адгезинов *fimH* ($n = 20$), *csgA* ($n = 20$), *focG* ($n = 4$), *papGII* ($n = 4$), *papGIII* ($n = 4$) и *sfaS* ($n = 3$); сидерофоров *fyuA* ($n = 15$), *iroN* ($n = 11$) и *iutA* ($n = 6$); токсинов *hlyA* ($n = 7$), *cnf1* ($n = 5$) и *usp* ($n = 9$); транспортёров капсулы *kpsMTII* ($n = 13$); факторов противодействия иммунитету *ompT* ($n = 16$) и *traT* ($n = 11$); колицина *cvaC* ($n = 1$); а также островов патогенности I₅₃₆ ($n = 5$), II₅₃₆ ($n = 4$), III₅₃₆ ($n = 1$), IV₅₃₆ ($n = 15$), II₁₉₆ ($n = 5$) и II_{CFT073} ($n = 9$). Гены адгезинов *papGI* и *afa/draBC*, транспортёра капсулы 3-го типа *kpsMTIII* и острова патогенности I₁₉₆ и I_{CFT073} в этих штаммах не обнаружены (табл. 2).

В разных штаммах UPEC было выявлено разное количество генов вирулентности — от 2 до 14. Гены адгезинов были идентифицированы во всех изучаемых штаммах, гены сидерофоров — в 18, гены факторов противодействия иммунитету — в 17, гены транспортеров капсулы — в 14, гены токсинов — в 9, ген колицина — в 1, острова патогенности — в 15 штаммах. Анализ сочетания факторов вирулентности разных функциональных групп показал, что 7 штаммов несли все 7 групп, 1 штамм — 6 групп, 4 штамма — 5 групп, 4 штамма — 4 группы, 2 штамма — 3 группы, 2 штамма — 1 группу.

Вирулентность штаммов UPEC для личинок *G. mellonella*

На основании значений ЛД₅₀ для личинок *G. mellonella* исследуемые штаммы разделены на 2 категории вирулентности: высоковирулентные штаммы с ЛД₅₀ < 10⁶ КОЕ ($n = 13$) и слабовирулентные с ЛД₅₀ > 10⁶ КОЕ ($n = 7$), как описано в работе [15]. Показано, что все штаммы в дозе более $1,0 \times 10^8$ КОЕ/особь вызывали гибель 100% личинок на 7-е сутки после заражения. При этом ~10% личинок погибали при заражении высоковирулентными штаммами в дозе 10⁴ КОЕ/особь и слабовирулентными штаммами в дозе 10⁶ КОЕ/особь. При заражающей дозе 10⁶ КОЕ/особь выявлялись наибольшие различия в уровнях вирулентности штаммов двух категорий: высоковирулентные штаммы в этой дозе вызывали гибель ~90% личинок, а слабовирулентные — ~10% личинок. На этом основании доза заражения личинок 10⁶ КОЕ/особь использована для дифференциации изучаемых штаммов *E. coli* по вирулентности (рис. 1). Доказана статистическая достоверность дифференциации штаммов на высоковирулентные и слабовирулентные для личинок *G. mellonella* в интервале доз заражения 10⁵–10⁷ КОЕ/особь при коэффициенте $p < 0,01$.

О-групповая принадлежность, филогенетические группы и сиквенс-типы штаммов UPEC

В ходе исследования идентифицированы 10 О-групп *E. coli*: O25 ($n = 3$), O2 ($n = 2$), O11 ($n = 2$), O18 ($n = 2$), O4 ($n = 1$), O6 ($n = 1$), O9 ($n = 1$), O15 ($n = 1$), O75 ($n = 1$) и O89 ($n = 1$). Для 5 штаммов О-группы не идентифицированы с помощью использованного метода типирования. Определена принадлежность штаммов к филогруппам А ($n = 4$), В1 ($n = 3$), В2 ($n = 10$), Е ($n = 1$) и F ($n = 2$). Идентифицированы 14 ранее известных сиквенс-типов *E. coli*: ST14 ($n = 1$), ST58 ($n = 1$), ST69 ($n = 1$), ST-73 ($n = 1$), ST93 ($n = 1$), ST127 ($n = 1$), ST131 ($n = 3$), ST141 ($n = 2$), ST165 ($n = 1$), ST297 ($n = 1$), ST457 ($n = 2$), ST537 ($n = 1$), ST744 ($n = 1$) и ST1434 ($n = 1$), а также два новых, ранее не описанных сиквенс-типа ST10102 и ST9239 (табл. 2).

К филогруппе А отнесены штаммы О-групп O18, O89; к филогруппе В1 — O9; к филогруппе В2 — O2, O4, O6, O18, O25, O75; к филогруппе Е — O15; к филогруппе F — O11 О-групп. Показано, что 3 штамма O25-группы принадлежат к сиквенс-типу ST131, 2 штамма O11-группы — к сиквенс-типу ST457, два штамма O2-группы — к сиквенс-типу ST141. Два штамма O18-группы отнесены к разным сиквенс-типам (ST14 и ST1434) и разным филогруппам (В2 и А; табл. 2).

Стоит отметить, что серогруппы O4, O6, O9, O11, O75 и O89 в данном исследовании идентифицированы только у высоковирулентных штаммов, а серогруппы O15 и O25 — только у слабовирулентных. Две серогруппы — O2 и O18 — были идентифицированы в группе как высоковирулентных, так и слабовирулентных штаммов. Филогруппы А, В1 и F определены только у высоковирулентных штаммов, в то время как филогруппа В2 — в обеих группах вирулентности. Среди 13 высоковирулентных

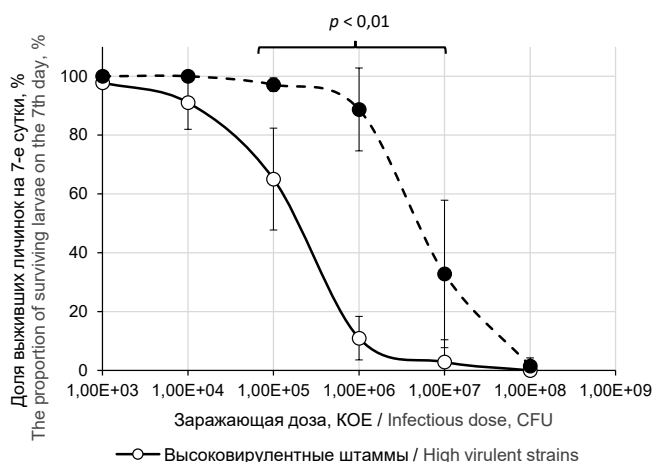


Рис. 1. Анализ вирулентности штаммов *E. coli* на модели личинок *G. mellonella*.

Fig. 1. Analysis of the virulence *E. coli* strains in the *G. mellonella* larvae model.

Таблица 2. Генетические детерминанты вирулентности, вирулентность для личинок *G. mellonella*, O-групповая принадлежность, филогенетические группы и сиквенс-типы изучаемых штаммов UPEC

Table 2. Genetic virulence determinants, virulence for larvae of *G. mellonella*, O-group affiliation, phylogenetic groups and sequence types of UPEC strains

Штамм <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> strain	Детектируемые гены факторов вирулентности / Detectable genes of virulence factors										ЛД ₅₀ , КОЕ LD ₅₀ , CFU	ОГ OG	ФГ PhG	СТ ST
	адгезины adhesins	сидерофоры siderophores	противодействие иммунитету anti-immunity	транспортер капсулы capsule transporter	токсины toxins	колицин kolitsin	остров патогенности island pathogenicity							
U18	fimH, csgA	fyuA	traT	kpsMTII	–	–	IV ₅₃₆	0,4 × 10⁵	NI	A	ST-93			
U10	fimH, csgA	iutA	ompT, traT	kpsMTII	–	–	–	0,9 × 10⁵	O11	F	ST457			
U22	fimH, csgA	iutA	ompT, traT	kpsMTII	–	–	–	1,0 × 10⁵	O11	F	ST457			
U8	fimH, csgA	fyuA	ompT, traT	–	–	–	IV ₅₃₆	0,2 × 10⁶	NI	B1	ST297			
U9	fimH, focG, papGIII, csgA	iroN, fyuA	ompT	kpsMTII	cnf1, hlyA, usp	–	IV ₅₃₆ , II _{CF1073} , I ₅₃₆ , II _{J96}	0,2 × 10⁶	O75	B2	ST537			
U15	fimH, sfaS, focG, papGIII, csgA	iroN, fyuA	ompT, traT	kpsMTII	cnf1, hlyA, usp	–	IV ₅₃₆ , II _{CF1073} , I ₅₃₆ , II _{J96}	0,3 × 10⁶	O2	B2	ST141			
U14	fimH, csgA	iroN, iutA, fyuA	ompT, traT	–	–	–	IV ₅₃₆	0,3 × 10⁶	O9	B1	ST58			
U24	fimH, csgA	–	–	–	–	–	–	0,3 × 10⁶	O89	A	ST744			
U13	fimH, csgA	iroN, fyuA	ompT, traT	–	–	–	IV ₅₃₆	0,4 × 10⁶	NI	A	ST165			
U17	fimH, focG, papGII, csgA	iroN, iutA, fyuA	ompT	kpsMTII	hlyA, usp	–	IV ₅₃₆ , II _{CF1073} , II ₅₃₆	0,5 × 10⁶	O6	B2	ST73			
U23	fimH, sfaS, papGIII, csgA	iroN, fyuA	ompT	kpsMTII	cnf1, hlyA, usp	–	IV ₅₃₆ , II ₅₃₆ , II _{CF1073} , I ₅₃₆ , II ₅₃₆ , II _{J96}	0,6 × 10⁶	O4	B2	ST127			
U26	fimH, csgA	iroN, iutA	–	–	–	–	–	0,6 × 10⁶	NI	B1	ST9239*			
U25	fimH, csgA	–	–	–	–	–	–	0,7 × 10⁶	O18	A	ST1434			
U11	fimH, papGII, csgA	iutA, fyuA	ompT	kpsMTII	usp	–	IV ₅₃₆ , II _{CF1073}	0,2 × 10⁷	O25	B2	ST131			
U12	fimH, papGII, csgA	iutA, fyuA	ompT, traT	kpsMTII	cnf1, hlyA, usp	–	IV ₅₃₆ , II _{CF1073} , I ₅₃₆ , II ₅₃₆ , II _{J96}	0,8 × 10⁷	O25	B2	ST131			
U20	fimH, papGII, csgA	iroN, iutA, fyuA	ompT, traT	kpsMTII	hlyA, usp	–	IV ₅₃₆ , II _{CF1073} , II ₅₃₆	0,9 × 10⁷	O18	B2	ST14			
U28	fimH, csgA	iutA, fyuA	ompT, traT	kpsMTII	usp	–	IV ₅₃₆ , II _{CF1073}	1,0 × 10⁷	O25	B2	ST131			
U16	fimH, csgA	iroN, fyuA	ompT, traT	kpsMTII	–	–	IV ₅₃₆	0,2 × 10⁸	O15	E	ST69			
U19	fimH, csgA	iroN, fyuA	ompT	–	–	–	IV ₅₃₆	0,2 × 10⁸	NI	B2	ST10102*			
U21	fimH, sfaS, focG, papGIII, csgA	iroN, fyuA	ompT	kpsMTII	cnf1, hlyA, usp	–	IV ₅₃₆ , II _{CF1073} , I ₅₃₆ , II _{J96}	0,7 × 10⁸	O2	B2	ST141			

Примечание. ОГ — O-группа; ФГ — филогенетическая группа; СТ — сиквенс-тип; NI — не определяется использованным методом; «-» — отсутствие гена; жирным шрифтом выделены значения ЛД₅₀ высоковирулентных штаммов; * — ST идентифицирован в данном исследовании.
Note. OG — O-group; PhG — phylogenetic group; ST — sequence type; NI — not determined by the method used, “-” — the absence of a gene; LD₅₀ values of highly virulent strains are highlighted in bold; * — ST identified in this study.

для личинок *G. mellonella* штаммов *E. coli* определены 12 сиквенс-типов, среди 7 слабовирулентных штаммов — 5 сиквенс-типов, сиквенс-тип ST141 был идентифицирован как у 1 высоковирулентного, так и у 1 слабовирулентного штамма (табл. 2).

Филогенетическое дерево

Анализ филогенетического родства сиквенс-типов штаммов UPEC выявил два кластера: кластер I, включающий ST457; и кластер II, объединяющий все остальные сиквенс-типы. Кластер II состоит из двух подкластеров: IIa (ST69) и IIb, который включает в себя две подгруппы: IIb-1 (ST14, ST73, ST127, ST131, ST141, ST537 и ST10102) и IIb-2 (ST58, ST93, ST165, ST297, ST744, ST1434 и ST9239). Расположение изученных штаммов UPEC на филогенетическом дереве сиквенс-типов полностью совпадает с принадлежностью штаммов к филогенетическим группам: в кластер I входят штаммы группы F, в подкластер IIa — E, в подкластер IIb-1 — B2 и в подкластер IIb-2 — A и B1. В кластер I и подгруппу IIb-2 вошли только высоковирулентные для личинок *G. mellonella* штаммы, в подкластер IIa — один слабовирулентный штамм, в подгруппу IIb-1 — как высоковирулентные, так и слабовирулентные штаммы. Новые сиквенс-типы ST9239 (IIb-1) и ST10102 (IIb-2) филогенетически наиболее близки к сиквенс-типам ST297 и ST73 соответственно (рис. 2).

Интересно отметить, что только штаммы UPEC, относящиеся к филогруппе B2, серогруппам O2, O4, O6, O18, O25, O75 и подгруппе IIb-1 филогенетического дерева, несли гены адгезинов *papGII*, *papGIII*, *sfaS* и *focG*, гены токсинов *hlyA*, *cnfI*, *usp*

и острова патогенности III₅₃₆, II_{CFT073}, I₅₃₆, II₅₃₆, II_{J96} (табл. 2).

Анализ полных геномов штаммов UPEC

Проанализированы 9 полногеномных последовательностей штаммов UPEC, которые характеризовались размерами 4,5–5,4 млн п.н. и ГЦ-составом 51–52%, несущих 4,3–5,2 тыс. генов (табл. 3). В геномах 7 штаммов выявлены генетические детерминанты, определяющие устойчивость к 10 функциональным классам АМП (β-лактамам, аминогликозидам, фениколам, фторхинолонам, полимиксином, сульфаниламидам, тетрациклином, макролидам, фосфомицином и четвертичным аммониевым соединениям). Кроме того, у 8 штаммов идентифицированы гены белка MdfA, обеспечивающего чрезвычайно широкий спектр лекарственной устойчивости (табл. 4). Спектр выявленных генетических детерминант антибиотикорезистентности коррелировал с описанными выше фенотипами устойчивости штаммов к АМП: наличие генов β-лактамаз — с устойчивостью к β-лактамам, генов аминогликозид-модифицирующих ферментов — с устойчивостью к аминогликозидам, гена *mcr* — с устойчивостью к колистину, мутаций в генах *gyrA* — с устойчивостью к фторхинолонам.

В геномах изучаемых штаммов обнаружены гены, кодирующие группы факторов вирулентности: адгезинов, сидерофоров, противодействия иммунитету макроорганизма, капсулообразования, токсинов, бактериоцинов и др. Отмечено значительное разнообразие геномов по количеству идентифицированных генов вирулентности — от 1 до 35. В геномах штаммов были выявлены до 6 генов адге-

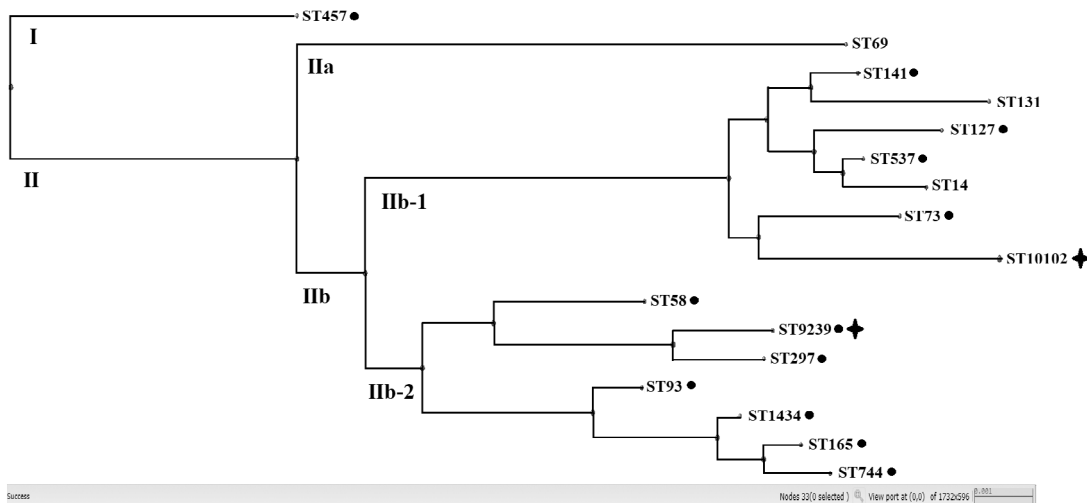


Рис. 2. Филогенетическое дерево штаммов UPEC, построенное на основании искусственно собранных нуклеотидных последовательностей генов МЛСТ-профиля.

Точкой обозначены сиквенс-типы высоковирулентных штаммов, звездочкой — новые сиквенс-типы.

Fig. 2. Phylogenetic tree of UPEC strains, built on the basis of artificially assembled nucleotide sequences of MLST-profile genes.

The point denotes the sequence types of highly virulent strains, the asterisk — new sequence types.

Таблица 3. Характеристика полных геномов штаммов UPEC
Table 3. Characterization of the whole genome sequences of UPEC strains

Штамм Strain	Код штамма Strain ID	Код доступа SRA SRA accession	Код доступа GenBank GenBank accession	ГЦ-состав, % GC-content, %	Размер генома, п. н. Genome size, bp	Количество контигов Number of contigs	N50	L50	Количество генов Number of genes
U10	SCPM-O-B-8551	SRR8517671	SERS010000000	51,7	5003875	143	164113	9	4702
U12	SCPM-O-B-8430	SRR8517670	SERT010000000	51,4	5222884	140	222568	7	5014
U14	SCPM-O-B-8552	SRR8517669	SERU000000000	51,4	4979967	155	155426	11	4692
U15	SCPM-O-B-8431	SRR8517668	SERV000000000	51,5	5391052	178	266427	8	5206
U19	SCPM-O-B-8724	SRR12512406	JACSYM000000000	52,0	4730654	236	36661	41	4402
U22	SCPM-O-B-8553	SRR8517667	SERW010000000	51,6	5015557	112	270519	7	4694
U24	SCPM-O-B-8432	SRR8517666	SERX000000000	51,1	4550637	130	113832	12	4255
U26	SCPM-O-B-8768	SRR12512405	JACSYL000000000	51,5	4912144	163	106301	15	4639
U28	SCPM-O-B-8433	SRR8517665	SERY000000000	51,3	5117977	128	222568	9	4912

Примечание. «SCPM-O-B» — State Collection of Pathogenic Microbes — Obolensk — Bacteria (Государственная коллекция патогенных микроорганизмов — Оболensk — Бактерии).
Note. «SCPM-O-B» — State Collection of Pathogenic Microbes — Obolensk — Bacteria.

Таблица 4. Генетические детерминанты устойчивости к АМП, идентифицированные в полных геномах штаммов UPEC
Table 4. Genetic determinants of antibacterial drug resistance identified in the complete genomes of UPEC strains

Штамм Strain	BL	AMI	QNL	POL	SUL	TET	MKL	FOS	MDR	QAC
U10	<i>bla</i> _{TEM-1B'}	<i>aac</i> (3)-IIa, <i>aph</i> (3')-Ia, <i>aadA1</i> , <i>aph</i> (6)-Id, <i>aph</i> (3')-Ib	<i>catA2</i> , <i>floR</i> , <i>gyrA</i>	<i>mcr-1.1</i>	<i>sul2</i> , <i>dfrA14</i>	<i>tet</i> (A)	—	—	<i>mdf</i> (A)	—
U12	<i>bla</i> _{OXA-17}	<i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>aac</i> (3)-IIa	<i>catB3</i> , <i>catB3</i> , <i>gyrA</i>	—	—	<i>tet</i> (A)	—	—	<i>mdf</i> (A)	—
U14	<i>bla</i> _{TEM-1B}	<i>aph</i> (3')-Ib, <i>aph</i> (6)-Id	—	—	<i>sul2</i> , <i>dfrA5</i>	—	—	—	<i>mdf</i> (A)	—
U15	—	—	—	—	—	—	—	—	<i>mdf</i> (A)	—
U19	—	—	—	—	—	—	—	—	<i>mdf</i> (A)	—
U22	<i>bla</i> _{TEM-1B'}	<i>aac</i> (3)-IIa, <i>aph</i> (3')-Ia, <i>aadA1</i> , <i>aph</i> (6)-Id, <i>aph</i> (3')-Ib	<i>catA2</i> , <i>floR</i> , <i>gyrA</i>	<i>mcr-1.1</i>	<i>sul2</i> , <i>dfrA14</i>	<i>tet</i> (A)	—	—	<i>mdf</i> (A)	—
U24	<i>bla</i> _{TEM-1B}	<i>aph</i> (6)-Id, <i>aph</i> (3')-Ib, <i>aadA5</i> , <i>aph</i> (3')-Ia	<i>gyrA</i>	—	<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA17</i>	<i>tet</i> (B)	<i>mph</i> (A)	—	<i>mdf</i> (A)	<i>qacE</i>
U26	<i>bla</i> _{CTX-M-27}	<i>aph</i> (3')-Ib, <i>aph</i> (3')-Ia, <i>aph</i> (6)-Id	<i>catA1</i> , <i>gyrA</i>	—	<i>sul2</i> , <i>dfrA17</i>	<i>tet</i> (B)	—	<i>fosA7</i>	—	—
U28	<i>bla</i> _{CTX-M-14'}	<i>aac</i> (6')-Ib3, <i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>aadA5</i>	<i>cmIA1</i> , <i>catA1</i> , <i>gyrA</i>	—	<i>sul1</i> , <i>dfrA17</i>	—	<i>mph</i> (A)	—	<i>mdf</i> (A)	<i>qacE</i>

Примечание. BL — β-лактамы; AMI — аминогликозиды; QNL — хинолоны; POL — полимиксины; SUL — сульфаниламиды; TET — тетрациклины; MKL — макролиды; FOS — фосфомицины; MDR — транспортёр, обеспечивающий множественную лекарственную устойчивость; QAC — четвертичные аммониевые соединения.
Note. BL — beta-lactams; AMI — aminoglycosides; QNL — quinolones; POL — polymyxins; SUL — sulfonamides; TET — tetracyclines; MKL — macrolides; FOS — fosfomycins; MDR — transporter providing multiple drug resistance; QAC — quaternary ammonium compounds.

зинов, до 6 генов сидерофоров, до 4 генов факторов противодействия иммунитету организма-хозяина, до 3 генов капсулообразования, до 5 генов токсинов, до 8 генов бактериоцинов и 1–5 генов других факторов вирулентности (табл. 5).

Обсуждение

Объектом данного исследования являлись штаммы уропатогенных *E. coli* — ведущего возбудителя ИМП как в России, так и во всём мире [2, 3]. Показано, что около половины охарактеризованных нами штаммов UPEC относятся к категории множественно резистентных, устойчивы к АМП 3 и более функциональных классов (β -лактамам, фторхинолонам, нитрофуранам, аминогликозидам, полимиксином), что согласуется с ранее опубликованными данными [3]. Поскольку все штаммы в нашем исследовании были чувствительны к фосфомицину, нитрофурантоину и меропенему, данные АМП могут рассматриваться в качестве препаратов выбора в клинической практике, что согласуется с данными, полученными для России [3].

Фенотипы множественной лекарственной устойчивости коррелировали с наличием генетических детерминант антибиотикорезистентности: генов β -лактамаз *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} и *bla*_{OXA} типов, генов аминогликозид-модифицирующих ферментов *aac*, *aph* и *aad* типов, гена колистин-модифицирующего фермента *mcr*, мутаций в гене ДНК-гиразы *gyrA*, обеспечивающих устойчивость к β -лактамам, аминогликозидам, колистину и фторхинолонам соответственно. Аналогичные гены были выявлены в штаммах UPEC в работе [6]. Обращает на себя внимание разнообразие идентифицированных аллелей эпидемически значимого гена БЛРС *bla*_{CTX-M} — 14, 15, 27 и 55, обнаруженных в трети изученных штаммов за достаточно короткий промежуток времени исследования у небольшой группы пациентов с внегоспитальными инфекциями. Это согласуется с большим разнообразием аллелей гена *bla*_{CTX-M} описанным в исследовании европейских авторов для госпитальных и внегоспитальных штаммов UPEC [26], а также с увеличением доли БЛРС-продуцирующих штаммов UPEC в России [3]. Необходимо подчеркнуть, что в 2 штаммах идентифицирован ген устойчивости к антибиотикам резерва колистину *mcr-1*.

В геномах изучаемых штаммов UPEC выявлено большое количество и разноо-

Таблица 5. Генетические детерминанты вирулентности, идентифицированные в полных геномах штаммов UPEC
Table 5. Genetic determinants of virulence identified in the complete genomes of UPEC strains

Штамм <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> strain	Адгезины, инвазины, агглютинины и фимбрии Adhesins, invasins, agglutinins and fimbriae	Сидерофоры Siderophores	Противодействие иммунитету Anti-immunity	Капсула и липополисахарид Capsule and lipopolysaccharide	Токсины Toxins	Бактериоцины Bacteriocins	Другие Others
U10	<i>iha</i> , <i>lpfA</i> , <i>yfcV</i>	<i>chuA</i> , <i>iucC</i> , <i>iutA</i> , <i>sitA</i>	<i>air</i> , <i>iss</i> , <i>ompT</i> , <i>traT</i>	<i>kpsE</i> , <i>kpsMII</i> , <i>wzx</i> ₀₁₁ , <i>wzy</i> ₀₁₁	<i>hlyF</i>	<i>сma</i> , <i>сvaC</i>	<i>eilA</i> , <i>gad</i> , <i>terC</i>
U14	<i>lpfA</i> , <i>hra</i>	<i>iucC</i> , <i>iutA</i> , <i>sitA</i> , <i>fyuA</i> , <i>iroN</i> , <i>irp2</i>	<i>iss</i> , <i>ompT</i> , <i>traT</i>	<i>wzm</i> ₀₉ , <i>wzt</i> ₀₉	<i>hlyF</i>	<i>cia</i> , <i>сvaC</i> , <i>mchF</i>	<i>gad</i> , <i>terC</i> , <i>etsC</i>
U15	<i>yfcV</i> , <i>hra</i> , <i>focC</i> , <i>papA_F12</i> , <i>papC</i> , <i>sfaD</i>	<i>chuA</i> , <i>sitA</i> , <i>fyuA</i> , <i>ireA</i> , <i>irp2</i>	<i>iss</i> , <i>ompT</i> , <i>traT</i>	<i>kpsE</i> , <i>kpsMII_K1</i> , <i>neuC</i> , <i>wzx</i> ₀₂ , <i>wzx</i> ₀₂ , <i>wzy</i> ₀₂	<i>hlyF</i> , <i>cnf1</i> , <i>usp</i> , <i>vat</i> , <i>astA</i>	<i>сea</i> , <i>сeib</i> , <i>сma</i> , <i>сvaC</i> , <i>mchB</i> , <i>mchC</i> , <i>mchF</i> , <i>mсma</i>	<i>gad</i> , <i>terC</i> , <i>clbB</i> , <i>epeA</i> , <i>tcpC</i>
U22	<i>iha</i> , <i>lpfA</i> , <i>yfcV</i>	<i>chuA</i> , <i>iucC</i> , <i>iutA</i> , <i>sitA</i>	<i>air</i> , <i>iss</i> , <i>ompT</i> , <i>traT</i>	<i>kpsE</i> , <i>kpsMII</i> , <i>wzx</i> ₀₁₁ , <i>wzy</i> ₀₁₁	<i>hlyF</i>	<i>сma</i> , <i>сvaC</i>	<i>eilA</i> , <i>gad</i> , <i>terC</i>
U24	—	—	—	<i>wzm</i> ₀₈₉ , <i>wzt</i> ₀₈₉	—	—	<i>terC</i>
U26	<i>lpfA</i>	<i>iucC</i> , <i>iutA</i> , <i>sitA</i> , <i>iroN</i>	<i>iss</i> , <i>ompT</i> , <i>traT</i>	—	<i>hlyF</i>	—	<i>terC</i> , <i>etsC</i>
U12	<i>iha</i> , <i>yfcV</i> , <i>hra</i> , <i>papA_F43</i> , <i>papC</i>	<i>chuA</i> , <i>sitA</i> , <i>fyuA</i> , <i>irp2</i> , <i>iucC</i>	<i>iss</i> , <i>ompT</i> , <i>traT</i>	<i>kpsE</i> , <i>kpsMII_K5</i> , <i>wzx</i> ₀₂₅ , <i>wzy</i> ₀₂₅	<i>cnf1</i> , <i>sat</i> , <i>usp</i>	—	<i>gad</i> , <i>terC</i>
U19	<i>yfcV</i> , <i>afaD</i> , <i>ibeA</i> , <i>papC</i>	<i>chuA</i> , <i>sitA</i> , <i>fyuA</i> , <i>iroN</i> , <i>irp2</i>	<i>iss</i> , <i>ompT</i> , <i>traT</i>	—	<i>hlyF</i> , <i>vat</i>	<i>cia</i>	<i>gad</i> , <i>terC</i> , <i>etsC</i>
U28	<i>iha</i> , <i>yfcV</i> , <i>papA_F43</i>	<i>chuA</i> , <i>iucC</i> , <i>iutA</i> , <i>sitA</i> , <i>fyuA</i> , <i>irp2</i>	<i>iss</i> , <i>ompT</i> , <i>traT</i>	<i>kpsE</i> , <i>kpsMII_K5</i> , <i>wzx</i> ₀₂₅ , <i>wzy</i> ₀₂₅	<i>sat</i> , <i>usp</i> , <i>senB</i>	<i>cia</i>	<i>terC</i>

Примечание. *astA* — ген термостабильного токсина EAST-1; *sat* — ген секретируемого токсин-автотранспортера; *senB* — плазмидный ген энтерооксина; *air* — ген энтероагрегативно-иммуноглобулина; *ireA* — ген рецептора сидерофора; *eilA* — ген транскрипционного регулятора острова патогенности; *gad* — ген декарбоксилазы; *etsC* — ген белка секреции типа I; *clbB* — ген поликетидметилтрансферазы; *epeA* — ген автотранспортера; *terC* — ген белка резистентности к ионам теллурита; *tcpC* — ген белка, содержащего Tir-домен.
Note. *astA* — gene of thermostable toxin EAST-1; *sat* — gene of the secreted toxin-vehicle; *senB* — enterotoxin plasmid gene; *air* — gene of enteroaggregative immunoglobulin; *ireA* — siderophore receptor gene; *eilA* — gene for the transcriptional regulator of the island of pathogenicity; *gad* — decarboxylase gene; *etsC* — type I secretion protein gene; *clbB* — polyketide megasynthase gene; *epeA* — vehicle transporter gene; *terC* — gene for the protein of resistance to tellurium ions; *tcpC* — gene for a protein containing a Tir domain.

бразии генетических детерминант вирулентности. Все штаммы имели гены *fimH* и *csaA*, что аналогично данным, описанным в работах других авторов [8, 27]. Ген *afa/draBC* в изученных нами штаммах *E. coli* не обнаружен, в то время как в работе [27] встречаемость данного гена составляла 15%. В нашем исследовании представленность генов *fyuA*, *iroN* и *iutA* составляла 83, 50 и 45%, что принципиально не отличается от данных других авторов: 78, 36–68 и 67% соответственно [8, 27]. Интересно отметить, что гены рецепторов сидерофоров в нашем исследовании чаще встречались в сочетаниях, чем индивидуально: *fyuA* + *iroN* ($n = 6$), *fyuA* + *iutA* ($n = 3$) и *fyuA* + *iroN* + *iutA* ($n = 3$). Гены факторов противодействия иммунитету макроорганизма *ompT* и *traT* были выявлены у большинства штаммов нашего исследования (83 и 61% соответственно), что аналогично другим данным — 75 и 71% соответственно [27]. Наличие генов *focG* и *sfaS* и оперона *pap* в нашем исследовании отмечено у 22, 17 и 44% изучаемых штаммов соответственно, что аналогично данным [8], но отличается от данных в других исследованиях — 50, 26 и 80% соответственно [27]. Ген *hlyA* в нашем исследовании идентифицирован у 39% штаммов, что примерно соответствует уровню встречаемости (42%) этого гена в исследовании российских авторов [8], но ниже, чем в работе [27] — 76%. Ген *cnfI* в нашем исследовании встречался у 28% штаммов, а в работе [27] — у 83% штаммов. Таким образом, в нашем исследовании у подавляющего большинства штаммов присутствовали гены адгезинов, сидерофоров и факторов противодействия иммунной системе.

Фенотипическое проявление вирулентности исследуемых штаммов UPEC изучали на модели личинок *G. mellonella*, которая широко используется для характеристики бактериальных уропатогенов [15, 16]. Показано, что множественно резистентным фенотипом обладали 6 высоковирулентных штаммов из 13, что указывает на вовлечённость в процесс объединения потенциалов вирулентности и антибиотикорезистентности UPEC.

Профили генов вирулентности, выявленные в нашей работе в полных геномах штаммов UPEC, различались у высоко- и слабовирулентных штаммов. Гены *lpfA*, *papA_F12*, *focC*, *sfaD*, *ireA*, *air*, *neuC*, *kpsMII_K1*, *astA*, *cta*, *cvaC*, *cea*, *celb*, *mchB*, *mchC*, *mchF*, *mcmA*, *eilA*, *tcpC* и *epeA* встречались только в геномах высоковирулентных штаммов, а гены *papA_F43*, *afaD*, *ibeA*, *kpsMII_K5*, *sat*, *senB* — только в геномах слабовирулентных штаммов.

Важно отметить, что исследованные в нашей работе внегоспитальные штаммы UPEC, как и во всем мире, характеризуются высокой степенью генетической гетерогенности: идентифицированы 3 филогенетические группы, 10 O-групп и 16 сиквенс-типов. По данным литературы, выявлен-

ные нами серогруппы O2, O6, O15, O25 и O75 относятся к числу часто встречающихся у UPEC [10, 13, 14]. Это согласуется также с тем, что в базе данных Enterobase⁷ на 20.09.2020 серогруппы O2, O4, O6, O18, O25 и O75 были представлены более чем 10 штаммами UPEC каждая, а серогруппы O9, O11, O15 и O89 — менее чем 10 штаммами каждая. Стоит отметить, что штаммы серогруппы O6 охарактеризованы как высоковирулентные для личинок *G. mellonella* и в нашем исследовании, и в работе [15]. В то же время штаммы O15- и O25-групп были отнесены нами к слабовирулентным для личинок *G. mellonella*, а штаммы O2- и O18-групп — и к высоковирулентным, и к слабовирулентным штаммам, что не совпадает с результатами исследования [15].

Показано, что штаммы 11 сиквенс-типов, в том числе нового ST-9239, принадлежат к категории высоковирулентных, а 4 сиквенс-типов, в том числе нового ST-10102, — к категории слабовирулентных. Сиквенс-тип ST-131, описанный в нашей работе, характерен для штаммов UPEC во всём мире (65 упоминаний среди UPEC в базе данных Enterobase на 20.09.2020). Другие характерные для UPEC сиквенс-типы ST69, ST73, ST127, ST14, ST58, ST93, ST141, ST457, ST537 и ST297, описанные в нашем исследовании, также представлены в базе данных Enterobase (от 1 до 106 упоминаний среди UPEC на 20.09.2020). В нашей работе впервые описаны штаммы *E. coli* сиквенс-типов ST165, ST744 и ST1434, выделенные от человека с ИМП; ранее эти сиквенс-типы были ассоциированы с другими патогруппами *E. coli* (согласно базе данных Enterobase на 20.09.2020). В нашем исследовании штаммы *E. coli* ST131 обладали слабой вирулентностью для личинок *G. mellonella*, что совпадает с результатами [15]. Интересно, что все штаммы этого сиквенс-типа в нашем исследовании принадлежали к серогруппе O25, а в упомянутой работе — не только к серогруппе O25, но и к другим серогруппам [15].

Высоко- и слабовирулентные штаммы UPEC подгруппы Пв-1 филогенетического дерева, относящиеся к характерным для UPEC филогруппе B2 и серогруппам O2, O4, O6, O18, O25 и O75, несли ген *usp*, кодирующий токсин — уропатогенный специфический белок Usp, что согласуется с опубликованными ранее данными о наличии ассоциации гена *usp* с сиквенс-типами ST131, ST69, ST73 и ST141 [9].

Полученные нами данные о принадлежности штаммов UPEC ST73 серогруппы O6 и ST127 серогруппы O4 к группе высоковирулентных для личинок *G. mellonella* аналогичны описанным в литературе [15]. В то же время штамм UPEC серогруппы O15 сиквенс-типа ST69 в нашем исследовании отнесён к слабовирулентным, а в работе [15] — к высоковирулентным UPEC. Особое внимание об-

⁷ URL: <http://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/ecoli>

ращают на себя два высоковирулентных для личинок *G. mellonella* штамма *E. coli* (O11, ST457), которые характеризовались устойчивостью к резервному антибиотику колистину и несли ген *mcr-1*. Ранее *mcr-1*-позитивные штаммы UPEC такого же сиквенс-типа были описаны в Китае [28]. В России этот ген был детектирован ранее в штаммах *E. coli* сиквенс-типов ST156 и ST359 [29].

Заключение

Описано генетическое разнообразие изученных внегоспитальных штаммов UPEC, относящихся к 3 филогенетическим группам, 10 O-группам и 16 сиквенс-типам и несущих разные наборы генетических детерминант факторов патогенности и антибиотикорезистентности. Все штаммы отнесены к категории резистентных, у половины из них определена множественная лекарственная устойчивость, обусловленная наличием генов устойчивости к β-лактамам, фторхинолонам, аминогликозидам и др., что согласуется с общемировой тенденцией распространения антибиотикорезистентности среди внегоспитальных патогенов. Идентифицированы две группы штаммов UPEC по степени вирулентности на модели личинок *G. mellonella* — высоковирулентные и слабовирулентные, геномы которых существенно отличались по наличию наборов генов адгезинов, сидерофоров, токсинов, факторов противодействия иммунитету макроорганизма, капсулообразования и островов патогенности. Описаны штаммы UPEC, характеризующиеся одновременно высокой вирулентностью и множественной лекарственной устойчивостью во внегоспитальной среде. Дальнейшее накопление данных позволит оценить эпидемиологическую ситуацию по ИМП, дать прогноз её развития в будущем, а также определить оптимальные направления терапии.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Öztürk R., Murt A. Epidemiology of urological infections: a global burden. *World J. Urol.* 2020; 38: 2669–79. <https://doi.org/10.1007/s00345-019-03071-4>
- Javed S., Mirani Z.A., Pirzada Z.A. Phylogenetic group B2 expressed significant biofilm formation among drug resistant uropathogenic *Escherichia coli*. *Libyan. J. Med.* 2021; 16(1): 1845444. <https://doi.org/10.1080/19932820.2020.1845444>
- Палагин И.С., Сухорукова М.В., Дехнич А.В., Эйдельштейн М.В., Перепанова Т.С., Козлов Р.С. Антибиотикорезистентность возбудителей внебольничных инфекций мочевых путей в России: результаты многоцентрового исследования «ДАРМИС-2018». *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2019; 21(2): 134–46. <https://doi.org/10.36488/cmac.2019.2.134-146>
- Medina M., Castillo-Pino E. An introduction to the epidemiology and burden of urinary tract infections. *Ther. Adv. Urol.* 2019; 11: 1756287219832172. <https://doi.org/10.1177/1756287219832172>
- Zhong Z.X., Cui Z.H., Li X.J., Tang T., Zheng Z.J., Ni W.N., et al. Nitrofurantoin combined with amikacin: a promising alternative strategy for combating MDR uropathogenic *Escherichia coli*. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2020; 10: 608547. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.608547>
- Naziri Z., Derakhshandeh A., Soltani Borcholeee A., Poor-maleknia M., Azimzadeh N. Treatment failure in urinary tract infections: A warning witness for virulent multi-drug resistant ESBL-producing *Escherichia coli*. *Infect. Drug Resist.* 2020; 13: 1839–50. <https://doi.org/10.2147/IDR.S256131>
- Sun D.H., Lv D.F., Mi Z.H., Hu L.Q., Huang Y., Gao X., et al. Investigation of antibiotic resistance determinants and virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Antibiot. (Tokyo).* 2020; 73(5): 314–9. <https://doi.org/10.1038/s41429-020-0284-7>
- Казанцев А.В., Осина Н.А., Глинская Т.О., Кошелева О.Н., Максимов Ю.В., Девдариани З.Л. и др. Факторы вирулентности и филогенетическая характеристика уропатогенных штаммов *Escherichia coli*, выделенных на территории г. Саратова. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2019; (4): 56–60. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2019-4-56-60>
- Nüesch-Inderbinen M.T., Baschera M., Zurfluh K., Hächler H., Nüesch H., Stephan R. Clonal diversity, virulence potential and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* causing community acquired urinary tract infection in Switzerland. *Front. Microbiol.* 2017; 8: 2334. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02334>
- Noie Oskouie A., Hasani A., Ahangarzadeh Rezaee M., Soroush Bar Haghi M.H., Hasani A., Soltani E. A relationship between O-serotype, antibiotic susceptibility and biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli*. *Microb. Drug. Resist.* 2019; 25(6): 951–8. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0330>
- Baldiris-Avila R., Montes-Robledo A., Buelvas-Montes Y. Phylogenetic classification, biofilm-forming capacity, virulence factors, and antimicrobial resistance in uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC). *Curr. Microbiol.* 2020; 77(11): 3361–70. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02173-2>
- Кузнецова М.В., Проворова С.В., Кубарев О.Г., Юдин Д.П., Каримова Н.В., Баяндина Н.В. и др. Сравнительная характеристика штаммов уропатогенной *Escherichia coli*, выделенных в условиях поликлиники и стационара. *Урология.* 2018; (6): 37–44. <https://doi.org/10.18565/urology.2018.6.37-44>
- Аминова Э.М., Бахарева Л.И. Характеристика *Escherichia coli*, выделенной из мочи пациентов при различных клинических ситуациях. *Вестник Челябинского государственного университета.* 2013; (7): 51–2.
- Казанцев А.В. Определение принадлежности к O-серогруппе по результатам молекулярно-генетического анализа уропатогенных штаммов *Escherichia coli*, выделенных от пациентов, находящихся на госпитализации в урологических отделениях на территории г. Саратов, с симптомами пиелонефрита и цистита. В кн.: *Материалы всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Аспирантские чтения – 2018».* Самара; 2018.
- Algoribi M.F., Gibreel T.M., Dodgson A.R., Beatson S.A., Upton M. *Galleria mellonella* infection model demonstrates high lethality of ST69 and ST127 uropathogenic *E. coli*. *PLoS One.* 2014; 9(7): e101547. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101547>
- Tsai C.J., Loh J.M., Proft T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence.* 2016; 7(3): 214–29. <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1135289>
- Magiorakos A.P., Srinivasan A., Carey R.B., Carmeli Y., Falagas M.E., Giske C.G., et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012; 18(3): 268–81. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Кузина Е.С., Асташкин Е.И., Лев А.И., Агеева Е.Н., Карцев Н.Н., Светоч Э.А. и др. Интегроны классов 1 и 2 в госпитальных штаммах грам-отрицательных бактерий, выделенных в Москве и регионах Российской Федерации. *Мо-*

- лекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2019; 37(1): 17–24. <https://doi.org/10.17116/molgen20193701117>
19. Sabaté M., Moreno E., Pérez T., Andreu A., Prats G. Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Clin. Microbiol. Infect.* 2006; 12(9): 880–6. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01461.x>
20. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. *Статистические методы в микробиологических исследованиях*. Ленинград: Наука; 1962.
21. Clermont O., Christenson J.K., Denamur E., Gordon D.M. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ. Microbiol. Rep.* 2013; 5(1): 58–65. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019>
22. Iguchi A., Iyoda S., Seto K., Morita-Ishihara T., Scheutz F., Ohnishi M., et al. *Escherichia coli* O-genotyping PCR: a comprehensive and practical platform for molecular O serogrouping. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53(8): 2427–32. <https://doi.org/10.1128/JCM.00321-15>
23. Alikhan N.F., Zhou Z., Sergeant M.J., Achtman M. A genomic overview of the population structure of *Salmonella*. *PLoS Genet.* 2018; 14(4): e1007261. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007261>
24. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012; 19(5): 455–77. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
25. Angiuoli S.V., Gussman A., Klimke W., Cochrane G., Field D., Garrity G., et al. Toward an online repository of Standard Operating Procedures (SOPs) for (meta)genomic annotation. *OMICs.* 2008; 12(2): 137–41. <https://doi.org/10.1089/omi.2008.0017>
26. Edowik Y., Caspari T., Williams H.M. The amino acid changes T55A, A273P and R277C in the beta-lactamase CTX-M-14 render *E. coli* resistant to the antibiotic nitrofurantoin, a first-line treatment of urinary tract infections. *Microorganisms.* 2020; 8(12): 1983. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121983>
27. Kudinha T., Kong F., Johnson J.R., Andrew S.D., Anderson P., Gilbert G.L. Multiplex PCR-based reverse line blot assay for simultaneous detection of 22 virulence genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012; 78(4): 1198–202. <https://doi.org/10.1128/AEM.06921-11>
28. Yu H., Qu F., Shan B., Huang B., Jia W., Chen C., et al. Detection of the *mcr-1* colistin resistance gene in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* from different hospitals in China. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016; 60(8): 5033–5. <https://doi.org/10.1128/AAC.00440-16>
29. Ageevets V., Lazareva I., Mrugova T., Gostev V., Lobzin Y., Sidorenko S. IncX4 plasmids harbouring *mcr-1* genes: further dissemination. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2019; 18: 166–7. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.07.002>
30. Zhong Z.X., Cui Z.H., Li X.J., Tang T., Zheng Z.J., Ni W.N., et al. Nitrofurantoin combined with amikacin: a promising alternative strategy for combating MDR uropathogenic *Escherichia coli*. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2020; 10: 608547. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.608547>
31. Naziri Z., Derakhshandeh A., Soltani Borchaloee A., Poor-maleknia M., Azimzadeh N. Treatment failure in urinary tract infections: A warning witness for virulent multi-drug resistant ESBL-producing *Escherichia coli*. *Infect. Drug Resist.* 2020; 13: 1839–50. <https://doi.org/10.2147/IDR.S256131>
32. Sun D.H., Lv D.F., Mi Z.H., Hu L.Q., Huang Y., Gao X., et al. Investigation of antibiotic resistance determinants and virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Antibiot. (Tokyo).* 2020; 73(5): 314–9. <https://doi.org/10.1038/s41429-020-0284-7>
33. Kazantsev A.V., Osina N.A., Glinskaya T.O., Kosheleva O.N., Maksimov Yu.V., Devdariani Z.L., et al. Virulence factors and phylogenetic characteristics of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated in Saratov. *Problemy osobo opasnykh infektsiy.* 2019; (4): 56–60. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2019-4-56-60> (in Russian)
34. Nüesch H., Stephan R. Clonal diversity, virulence potential and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* causing community acquired urinary tract infection in Switzerland. *Front. Microbiol.* 2017; 8: 2334. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02334>
35. Noie Oskouie A., Hasani A., Ahangarzadeh Rezaee M., Soroush Bar Haghi M.H., Hasani A., Soltani E. A relationship between O-serotype, antibiotic susceptibility and biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli*. *Microb. Drug. Resist.* 2019; 25(6): 951–8. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0330>
36. Baldiris-Avila R., Montes-Robledo A., Buelvas-Montes Y. Phylogenetic classification, biofilm-forming capacity, virulence factors, and antimicrobial resistance in uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC). *Curr. Microbiol.* 2020; 77(11): 3361–70. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02173-2>
37. Kuznetsova M.V., Provorova S.V., Kubarev O.G., Yudin D.P., Karimova N.V., Bayandina N.V., et al. Comparative characteristics of uropathogenic *Escherichia coli* strains, allocated in polyclinic and stationary conditions. *Urologiya.* 2018; (6): 37–44. <https://doi.org/10.18565/urology.2018.6.37-44> (in Russian)
38. Amineva E.M., Bakhareva L.I. Characteristics of *Escherichia coli* isolated from the urine of patients in various clinical situations. *Vestnik Chelyabinskogo gosudarstvennogo universiteta.* 2013; (7): 51–2. (in Russian)
39. Kazantsev A.V. Determination of belonging to the O-serogroup according to the results of molecular genetic analysis of uropathogenic strains of *Escherichia coli* isolated from patients hospitalized in urological departments in the city of Saratov with symptoms of pyelonephritis and cystitis. In: *Materials of the All-Russian Scientific-Practical Conference with International Participation «Postgraduate Readings – 2018» [Materialy vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem «Aspirantskie chteniya – 2018»]*. Samara; 2018. (in Russian)
40. Alghoribi M.F., Gibreel T.M., Dodgson A.R., Beatson S.A., Upton M. *Galleria mellonella* infection model demonstrates high lethality of ST69 and ST127 uropathogenic *E. coli*. *PLoS One.* 2014; 9(7): e101547. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101547>
41. Tsai C.J., Loh J.M., Proft T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence.* 2016; 7(3): 214–29. <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1135289>
42. Magiorakos A.P., Srinivasan A., Carey R.B., Carmeli Y., Falagas M.E., Giske C.G., et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired re-

REFERENCES

- sistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012; 18(3): 268–81. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
18. Kuzina E.S., Astashkin E.I., Lev A.I., Ageeva E.N., Kartsev N.N., Svetoch E.A., et al. Class 1 and class 2 integrons in hospital strains of gramnegative bacteria isolated in Moscow and other regions of the Russian Federation. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya.* 2019; 34(1): 16–24. <https://doi.org/10.3103/S0891416819010051>
 19. Sabaté M., Moreno E., Pérez T., Andreu A., Prats G. Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Clin. Microbiol. Infect.* 2006; 12(9): 880–6. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01461.x>
 20. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. *Statistical Methods in Microbiological Research [Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyakh]*. Leningrad: Nauka; 1962. (in Russian)
 21. Clermont O., Christenson J.K., Denamur E., Gordon D.M. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ. Microbiol. Rep.* 2013; 5(1): 58–65. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019>
 22. Iguchi A., Iyoda S., Seto K., Morita-Ishihara T., Scheutz F., Ohnishi M., et al. *Escherichia coli* O-genotyping PCR: a comprehensive and practical platform for molecular O serogrouping. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53(8): 2427–32. <https://doi.org/10.1128/JCM.00321-15>
 23. Alikhan N.F., Zhou Z., Sergeant M.J., Achtman M. A genomic overview of the population structure of *Salmonella*. *PLoS Genet.* 2018; 14(4): e1007261. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007261>
 24. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012; 19(5): 455–77. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
 25. Angiuoli S.V., Gussman A., Klimke W., Cochrane G., Field D., Garrity G., et al. Toward an online repository of Standard Operating Procedures (SOPs) for (meta)genomic annotation. *OMICS.* 2008; 12(2): 137–41. <https://doi.org/10.1089/omi.2008.0017>
 26. Edowik Y., Caspari T., Williams H.M. The amino acid changes T55A, A273P and R277C in the beta-lactamase CTX-M-14 render *E. coli* resistant to the antibiotic nitrofurantoin, a first-line treatment of urinary tract infections. *Microorganisms.* 2020; 8(12): 1983. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121983>
 27. Kudinha T., Kong F., Johnson J.R., Andrew S.D., Anderson P., Gilbert G.L. Multiplex PCR-based reverse line blot assay for simultaneous detection of 22 virulence genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012; 78(4): 1198–202. <https://doi.org/10.1128/AEM.06921-11>
 28. Yu H., Qu F., Shan B., Huang B., Jia W., Chen C., et al. Detection of the *mcr-1* colistin resistance gene in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae from different hospitals in China. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016; 60(8): 5033–5. <https://doi.org/10.1128/AAC.00440-16>
 29. Ageevets V., Lazareva I., Mrugova T., Gostev V., Lobzin Y., Sidorenko S. IncX4 plasmids harbouring *mcr-1* genes: further dissemination. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2019; 18: 166–7. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.07.002>

Информация об авторах

Слукин Павел Владимирович[✉] — н.с. лаб. антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Россия, xopgi@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4976-0145>

Асташкин Евгений Ильич — к.м.н., в.н.с. лаб. антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3559-9071>

Асланян Елена Мкртчичевна — к.б.н., н.с. отдела дезинфектологии ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9538-9968>

Ершова Марина Геннадьевна — зав. микробиологической лаб. Инфекционной клинической больницы № 1, Ярославль, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4691-648X>

Полеаева Елена Дмитриевна — врач-бактериолог Инфекционной клинической больницы № 1, Ярославль, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7074-6989>

Светоч Эдуард Арсеньевич — д.вет.н., профессор, г.н.с. лаб. антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3185-1954>

Шепелин Анатолий Прокопьевич — д.б.н., зам. директора по научной и производственной работе ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8253-7527>

Фурсова Надежда Константиновна — к.б.н., в.н.с. лаб. антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6053-2621>

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

Статья поступила в редакцию 27.09.2021;
принята к публикации 12.11.2021;
опубликована 25.12.2021

Information about the authors

Pavel V. Slukin[✉] — researcher, Laboratory of antimicrobial agents, Molecular microbiology department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia, xopgi@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4976-0145>

Eugeny I. Astashkin — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of antimicrobial agents, Molecular microbiology department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3559-9071>

Elena M. Aslanyan — researcher, Disinfectology department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9538-9968>

Marina G. Ershova — Head, Microbiology laboratory, Infectious Clinical Hospital No. 1, Yaroslavl, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4691-648X>

Elena D. Poletaeva — bacteriologist, Microbiology laboratory, Infectious Clinical Hospital No. 1, Yaroslavl, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7074-6989>

Edward A. Svetoch — D. Sci. (Vet.), Professor, chief researcher, Laboratory of antimicrobial agents, Molecular microbiology department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3185-1954>

Anatoly P. Shepelin — D. Sci. (Biol.), Deputy Director for scientific and industrial Work, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8253-7527>

Nadezhda K. Fursova — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of antimicrobial agents, Molecular microbiology department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6053-2621>

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

The article was submitted 27.09.2021;
accepted for publication 12.11.2021;
published 25.12.2021



Эпидемиологические особенности инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр

Соломай Т.В.^{1,2✉}, Семенов Т.А.^{3,4}, Тутельян А.В.⁵, Боброва М.В.⁶

¹Межрегиональное управление № 1 ФМБА России, Москва, Россия;

²Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия;

³Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия;

⁴Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

⁵Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

⁶Национальный научно-исследовательский институт общественного здоровья имени Н.А. Семашко, Москва, Россия

Аннотация

Введение. Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) — один из самых распространённых патогенов — поражённость им населения достигает 90%. В то же время не установлены особенности эпидемического процесса ВЭБ-инфекции. Ранее проведённые исследования посвящены оценке показателей заболеваемости инфекционным мононуклеозом (ИМ) без учёта серологического статуса населения.

Цель работы — выявить эпидемиологические особенности и оценить превалентность серологических маркеров ВЭБ-инфекции для последующей разработки комплекса противоэпидемических мероприятий.

Материалы и методы. В Москве анализу подвергнуты данные заболеваемости ИМ (форма № 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях») и результаты обследования 138 232 человек на наличие IgG VCA, IgG EBNA, IgM VCA, IgG EA, ДНК ВЭБ в образцах крови и слюны в 2011–2020 гг.

Результаты. Впервые установлены периодичность заболеваемости ИМ с интервалом 9–11 лет и её сильные прямые значимые корреляционные связи с выявлением маркеров активной ВЭБ-инфекции. Для внутригодичной динамики заболеваемости ИМ характерен сезонный подъём в холодный период года с максимальными показателями в октябре, ноябре или феврале, обусловленный выраженным снижением серопревалентности IgG VCA и IgG EBNA. Группами риска по заболеваемости первичной инфекцией являются дети 1–17 лет, что подтверждается достоверно более низкой, по сравнению со взрослыми, частотой выявления маркеров хронической ВЭБ-инфекции (IgG VCA и IgG EBNA) и высокой — IgM VCA и ДНК ВЭБ в крови. Вклад взрослого населения в эпидемический процесс формируется за счёт реактивации хронической инфекции, преимущественно у женщин.

Заключение. Выявленные особенности позволяют дать развёрнутую характеристику эпидемического процесса ВЭБ-инфекции и могут быть использованы для разработки комплекса профилактических и противоэпидемических мероприятий.

Ключевые слова: вирус Эпштейна–Барр, инфекционный мононуклеоз, серопревалентность, заболеваемость, эпидемиологические особенности

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Советом по этике ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова (протокол № 1 от 23.03.2021).

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: Соломай Т.В., Семенов Т.А., Тутельян А.В., Боброва М.В. Эпидемиологические особенности инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(6):685–696.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-139>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-139>

Epidemiological characteristics of Epstein–Barr virus infection

Tatyana V. Solomay^{1,2✉}, Tatiana A. Semenenko^{3,4}, Aleksey V. Tutelyan⁵, Maria V. Bobrova⁶¹Interregional Department No. 1 of the FMBA of Russia, Moscow, Russia;²I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia;³National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia;⁴I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia;⁵Central Research Institute of Epidemiology, Moscow;⁶Semashko National Research Institute of Public Health, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. The Epstein–Barr virus (EBV) is one of the most common pathogens — it infects 90% of the world's population. However, specific characteristics of the EBV infection epidemic process remain unidentified. The previous studies focusing on assessment of incidence rates for infectious mononucleosis (IM) tend to ignore the serological status of the population.

The **aim** of the study was to identify epidemiological characteristics and assess the prevalence of serological markers for EBV infection for further epidemic control measures development.

Materials and methods. In Moscow, the thorough analysis was performed using the data on IM incidence (Form 2 "Data on Infectious and Parasitic Diseases") and test results for 138,232 people checked for presence of VCA IgG, EBNA IgG, VCA IgM, EA IgG, and EBV DNA in their blood and saliva in 2011–2020.

Results. The periodic pattern of IM incidence was discovered, demonstrating the repetitive peaks every 9 to 11 years and a strong direct correlative relationship with detection rates for active EBV infection markers. The intra-annual dynamics of IM incidence is characterized by a seasonal upswing during cold seasons of the year, reaching its peaks in October, November, or February and associated with a marked decrease in the VCA IgG and EBNA IgG seroprevalence. Children within the 1 to 17-year age range are groups at risk for acquiring primary infection, demonstrating significantly lower detection rates for chronic EBV infection (VCA IgG and EBNA IgG) markers and higher rates for VCA IgM and EBV DNA markers in blood compared to adults. The contribution of adult population to the epidemic process is formed through reactivation of chronic infection, which is observed primarily among women.

Conclusion. The identified characteristics are essential for comprehensive understanding of the EBV infection epidemic process and can be used for developing preventive and anti-epidemic measures.

Keywords: Epstein–Barr virus, infectious mononucleosis, seroprevalence, incidence, epidemiological characteristics

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Bioethics Committee of the Institute of Federal State Burdgetarry Institution "I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera" (Protocol No.1, March 23, 2021).

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: Solomay T.V., Semenenko T.A., Tutelyan A.V., Bobrova M.V. Epidemiological characteristics of Epstein–Barr virus infection. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(6):685–696.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-139>

Введение

Несмотря на то, что инфекция, вызванная вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ), известна давно, её эпидемиологические особенности остаются практически не изученными. На настоящий момент установлено, что источником ВЭБ является больной человек с первичной острой инфекцией или реактивацией хронического процесса [1, 2]. Передача возбудителя осуществляется через воздух, при контакте со слюной и контаминированными ей предметами [1, 3], вертикально от матери плоду

[4], при пересадке органов и тканей [5], переливании донорской крови и её компонентов, не прошедших процедуру патогенредукции и лейкофльтрации [6, 7]. Инкубационный период составляет в среднем 42 дня при первичной острой ВЭБ-инфекции [8], после перенесения которой процесс переходит в хронический [9]. Таким образом, ВЭБ пожизненно сохраняется в организме человека, а периоды латентного течения сменяются реактивациями, при которых происходит репродукция вируса [1, 2].

Эпидемиологическое значение имеют в первую очередь первичная острая инфекция и реактивация хронической инфекции, получившие название активной ВЭБ-инфекции [10]. Во время латентной фазы хронической инфекции ВЭБ находится в ядре клетки хозяина в виде кольцевой эписомы [11]. Причины перехода от латентного состояния к реактивации на настоящий момент обсуждаются. Высказываются предположения о триггерной роли внешних факторов физической, химической и биологической природы [12]. Ряд исследователей считают, что репродукции вируса предшествует снижение иммунологической реактивности организма хозяина, которое, в свою очередь, также может быть вызвано воздействием внешних негативных факторов [13].

ВЭБ имеет повсеместное распространение, при этом более чем у 90% взрослого населения обнаруживаются маркеры хронической инфекции — иммуноглобулины G к капсидному (IgG VCA) и нуклеарному (IgG EBNA) антигенам вируса. При выявлении ДНК вируса в крови и/или слюне, IgM к капсидному (IgM VCA) и IgG к раннему (IgG EA) антигенам состояние трактуется как активная ВЭБ-инфекция [7]. Клинически манифестная форма активной ВЭБ-инфекции проявляется в виде инфекционного мононуклеоза (ИМ), возможно также стёртое и бессимптомное течение заболевания [14, 15].

Статистический учёт случаев ИМ осуществляется в России с 1990 г. На протяжении всего периода наблюдения заболеваемость имеет выраженную тенденцию к росту. В разных регионах страны показатели существенно различаются, что может быть связано как с особенностями эпидемического процесса, так и с погрешностями диагностики и регистрации данной нозологической формы [16].

Большинство исследований в России и за рубежом, посвящённых ВЭБ-инфекции в целом и ИМ в частности, носят клиническую или иммунологическую направленность. Незначительное число эпидемиологических исследований не позволило однозначно установить периодичность подъёмов и спадов заболеваемости [14, 17, 18]. Наиболее вероятной причиной этого является подход, основанный на оценке исключительно показателей заболеваемости без учёта серологического статуса населения исследуемой территории. В связи с этим особую значимость в условиях гетерогенности популяции приобретает оценка распространённости маркеров инфицирования вирусом с помощью серологического мониторинга, являющегося компонентом блока информационного обеспечения системы эпидемиологического надзора за заболеваемостью [19]. Проведёнными исследованиями установлено, что основными группами риска по заболеваемости ИМ являются дети дошкольного и школьного возраста [14, 18, 20, 21]. Вклад взрослого населения в эпидемиче-

ский процесс ВЭБ-инфекции практически не изучен, как и не проведена оценка по гендерному признаку. Всё это определяет актуальность и создаёт предпосылки к целенаправленному изучению особенностей эпидемического процесса ВЭБ-инфекции.

Целью настоящей работы стали выявление эпидемиологических особенностей и оценка превалентности серологических маркеров ВЭБ-инфекции для последующей разработки комплекса противоэпидемических мероприятий.

Материалы и методы

Город для проведения настоящего исследования был выбран на основании результатов ранжирования регионов России по средним многолетним уровням заболеваемости ИМ, на основании которого Москва была отнесена к территориям со средними значениями, попадающими в интервал $M \pm \sigma$ [16]. Дополнительным фактором в пользу проведения исследования в столице (мегаполисе) стало наличие широкой сети медицинских организаций и лабораторий, осуществляющих диагностику на наличие маркеров ВЭБ-инфекции.

Материалами для настоящего исследования послужили данные официальной регистрации заболеваемости ИМ в Москве и России за 2000–2019 гг. (форма № 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях») и обобщённые данные результатов обследования на наличие маркеров хронической латентной (IgG VCA и IgG EBNA) и активной ВЭБ-инфекции (IgM VCA, IgG EA, ДНК ВЭБ в крови и слюне) жителей г. Москвы за 2011–2020 гг., предоставленные ООО «Независимая лаборатория ИНВИТРО». У пациентов получено добровольное информированное согласие. Протокол исследования одобрен Советом по этике ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова (протокол № 1 от 23.03.2021).

Всего в 2011–2020 гг. на наличие IgG VCA было исследовано 134 462 образца биопроб от мужчин и женщин разных возрастных групп, IgG EBNA — 138 232, IgM VCA — 161 285, IgG EA — 82 556. Исследования на наличие ДНК ВЭБ в крови и слюне были введены только в 2014 г. За 2014–2020 гг. на наличие ДНК ВЭБ исследованы 39 683 пробы крови и 13 702 пробы слюны. Пробы, отобранные повторно от одних и тех же людей, в исследование не включались.

Оценка данных официальной регистрации заболеваемости и результатов лабораторного исследования выполнена методом ретроспективного эпидемиологического анализа с последующей статистической обработкой. Проведён расчёт показателей заболеваемости ИМ на 100 тыс. населения, частоты выявления маркеров ВЭБ-инфекции на 100 обследованных (%). Определены средние многолетние уровни и их 95% доверительные интервалы (ДИ). Различия считались значимыми при вероятности

отвергнуть верную нулевую гипотезу (p) менее 5%, т.е. при $p < 0,05$. Верхний предел фонового значения для внутригодичной заболеваемости рассчитан по методике [22].

Для обнаружения связи между частотой выявления маркеров ВЭБ-инфекции и заболеваемостью ИМ использован коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r). Связь считалась сильной при r , равном $\pm 0,7$ и более. Отрицательное значение коэффициента указывало на обратную корреляционную связь, положительное — на прямую.

Результаты

Заболеваемость ИМ населения Москвы в 2000–2020 гг. была незначительно выше, чем в России (рис. 1), — средние многолетние уровни составили 19,5 (95% ДИ 11,1–27,9) и 13,8 (95% ДИ 7,7–19,9) на 100 тыс. населения соответственно, различия недостоверны. Исключение составили 2015–2018 гг., когда общероссийская заболеваемость несколько превысила показатели в столице.

При сопоставлении тенденций многолетней динамики установлено, что в России в 2000–2019 гг. заболеваемость ИМ неуклонно росла. В то же время в Москве имела место периодичность подъёмов и спадов заболеваемости с шагом 9–11 лет. Так, наиболее высокие показатели были выявлены в 2010 и 2019 гг. (24,11 и 24,73 на 100 тыс. населения соответственно), низкие — в 2004, 2015 гг. (15,3 и 18,0 на 100 тыс. соответственно). Интенсивное снижение заболеваемости ИМ в 2020 г. по сравнению с 2019 г. в Москве и в России может быть связано как с истинным уменьшением числа заболевших, так и с более низкой выявляемостью данной нозологической формы на фоне пандемии COVID-19.

Внутригодичная динамика заболеваемости ИМ в Москве в 2014–2020 гг. характеризовалась наличием сезонного подъёма в холодный период года с октября по апрель. Наиболее высокие за исследуемый период средние показатели отмечены в октябре, ноябре и феврале (1,86; 1,89 и 1,82 на 100 тыс. населения соответственно; рис. 2). Необходимо отметить, что ни в один год сезонный пик заболеваемости не выпадал на другие месяцы. Так, в 2014 и 2020 гг. максимум был зарегистрирован в феврале (2,05 и 2,23 на 100 тыс. населения соответственно), в 2015 и 2019 гг. — в ноябре (1,79 и 2,73), в 2016–2018 гг. — в октябре (2,07; 1,99; 2,23). При этом наиболее низкая заболеваемость в октябре и ноябре была отмечена в 2020 г. (0,93 и 1,41 на 100 тыс. населения соответственно), высокая — в 2019 г. (2,31 и 2,73). В феврале минимальный показатель был выявлен в 2017 г. (1,36), максимальный — в 2020 г. (2,23).

Во все годы наиболее высокие показатели заболеваемости ИМ регистрировались среди детского населения в возрастных группах 1–2, 3–6, 7–14 и 15–17 лет. Лица 18 лет и старше и дети до 1 года вовлекались в эпидемический процесс в меньшей степени.

При сопоставлении периода с более высокими показателями заболеваемости ИМ (2009–2013 гг.) с периодом с низкими показателями (2014–2018 гг.) достоверные различия в средних многолетних уровнях отмечены для всех возрастных групп ($p < 0,05$), за исключением лиц 18 лет и старше ($p > 0,05$). Показатели средней многолетней заболеваемости совокупного населения в 2009–2013 и 2014–2018 гг. достоверных различий не имели ($p > 0,05$; рис. 3).

В то же время выявлены изменения в возрастной структуре заболевших. В годы с более низки-

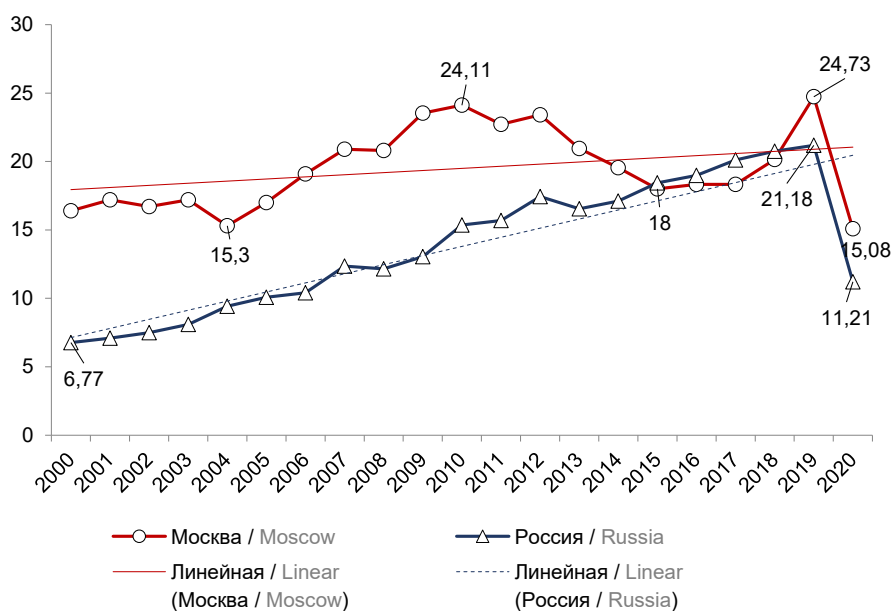


Рис. 1. Заболеваемость ИМ населения Москвы и России в 2000–2020 гг. (на 100 тыс. населения).

Fig. 1. IM incidence among the population in Moscow and Russia during 2000-2020 (per 100,000 population).

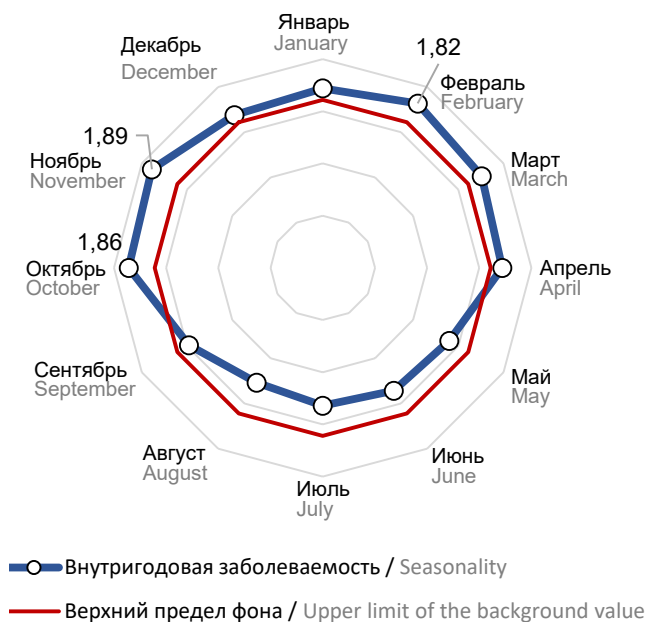


Рис. 2. Внутригодовая динамика заболеваемости ИМ в Москве: средние многолетние уровни за период 2014–2020 гг. (на 100 тыс. населения).

Fig. 2. Intra-annual dynamics of IM incidence in Moscow: multiannual average rates during 2014–2020 (per 100,000 population).

ми показателями заболеваемости (2014–2018 гг.) по сравнению с 2009–2013 гг. отмечено достоверное снижение удельного веса лиц в возрасте 1–2 года — с 12,4 (95% ДИ 11,9–12,95) до 11,0% (95% ДИ 10,5–11,6) и 15–17 лет — с 14,4 (95% ДИ 13,8–15,0) до 12,4 (95% ДИ 11,8–13,0) и достоверное увеличение доли заболевших в возрасте 18 лет и старше — с 28,6% (95% ДИ 27,8–29,4) до 31,1% (95% ДИ 30,3–31,9).

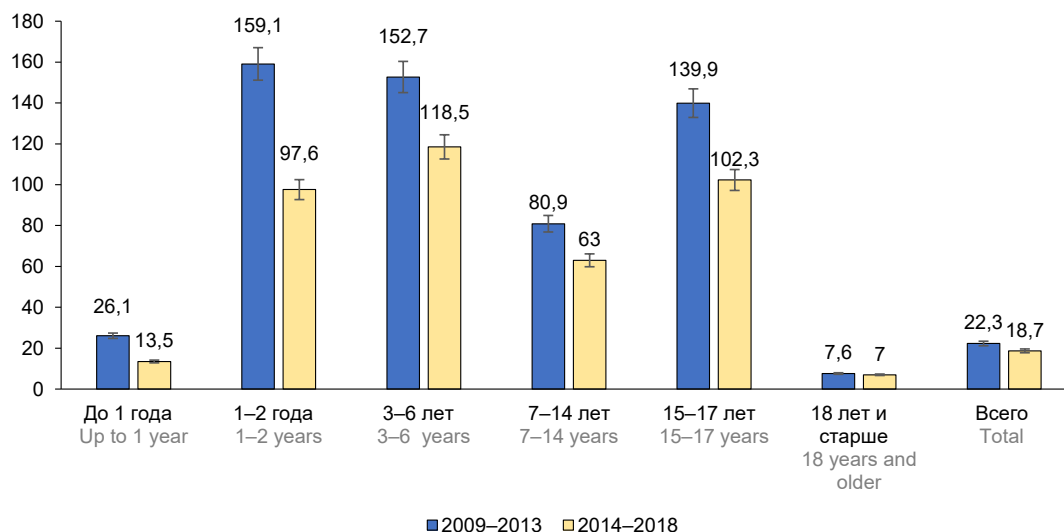


Рис. 3. Средние многолетние уровни заболеваемости ИМ в 2009–2013 и 2014–2018 гг. в Москве на 100 тыс. населения.

Fig. 3. Multiannual average rates of IM incidence during 2009–2013 and 2014–2018 in Moscow per 100,000 population.

Анализ данных о результатах исследования на наличие маркеров хронической латентной ВЭБ-инфекции выявил высокую распространённость IgG VCA и IgG EBNA у жителей Москвы. Среди совокупного населения за весь период исследования серопревалентность IgG VCA была достоверно ($p < 0,05$) выше таковой IgG EBNA — 74,9% (95% ДИ 74,7–75,1) и 70,4% (95% ДИ 70,2–70,7) соответственно. Самый высокий показатель по совокупному населению для IgG VCA был зарегистрирован в 2019 г. — 76,1% (95% ДИ 75,5–76,8), низкий — в 2013 г. (73,6%; 95% ДИ 72,9–74,3; $p < 0,05$). Соответственно для IgG EBNA — в 2011 — 72,1% (95% ДИ 71,2–72,9) и 2013 — 69,0 (95% ДИ 68,2–69,7; $p < 0,05$). При сопоставлении многолетней динамики заболеваемости ИМ и изменения уровней серопревалентности в 2011–2020 гг. коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r) с IgG VCA составил 0,35, с IgG EBNA — 0,3. В обоих случаях связь слабая прямая незначимая.

Во внутригодовой динамике в 2014–2020 гг. наиболее высокие уровни серопревалентности по IgG VCA регистрировались с июня по сентябрь с максимумом в сентябре — 78,4% (95% ДИ 77,6–79,3). В эти же месяцы наиболее высокие уровни зарегистрированы и для IgG EBNA (максимум в августе 73,1% (95% ДИ 72,1–74,0)). Минимальные значения установлены в ноябре — 71,9% (95% ДИ 71,1–72,7) и 67,7% (95% ДИ 66,9–68,5) соответственно (рис. 4). Различия между максимальными и минимальными показателями для каждого маркера достоверны.

При сопоставлении внутригодовой динамики заболеваемости ИМ с изменениями уровней серопревалентности IgG VCA и IgG EBNA по месяцам за 2014–2020 гг. установлена значимая сильная обратная корреляционная зависимость: коэффициент

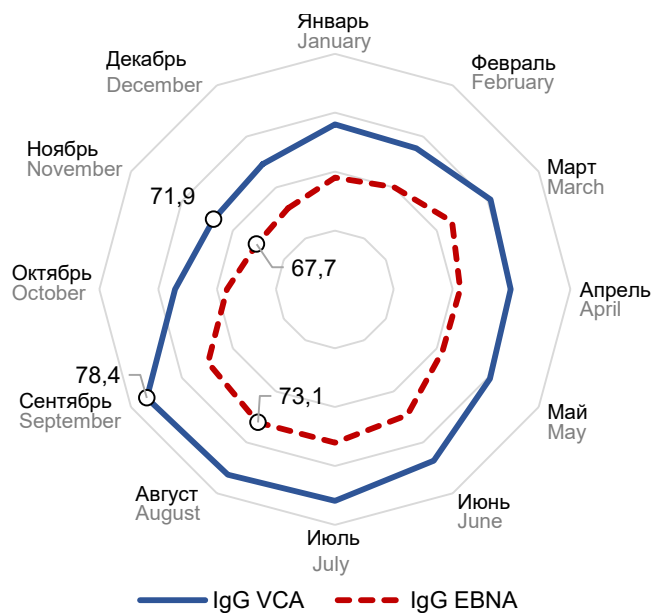


Рис. 4. Внутригодовая динамика серопревалентности IgG VCA и IgG EBNA в Москве в 2014–2020 гг. (%).

Fig. 4. Intra-annual dynamics of VCA IgG and EBNA IgG seroprevalence in Moscow during 2014–2020 (%).

ранговой корреляции Спирмена (r) составил $-0,8$ и $-0,77$ соответственно. При этом началу сезонного подъёма заболеваемости соответствует резкое снижение серопревалентности по обоим маркерам.

Показатели серопревалентности в возрастной группе 0–17 лет (IgG VCA 54,9% и IgG EBNA 48,8%) были достоверно ниже, чем среди лиц в возрасте 18–39 лет (IgG VCA 95,0% и IgG EBNA 92,6%), 40–59 лет (IgG VCA 96,8% и IgG EBNA 93,2%), 60 лет и старше (IgG VCA 97,0% и IgG EBNA 92,0%); $p < 0,05$. Необходимо отметить, что серопревалентность IgG VCA увеличивалась с возрастом обследованных, достигнув своего

максимума в возрастной группе 60 лет и старше. В то же время аналогичный показатель IgG EBNA был наиболее высоким в возрастной группе 40–59 лет, а в более старшем возрасте выявлено его достоверное снижение (табл. 1).

Серопревалентность IgG VCA и IgG EBNA в группе женщин была достоверно выше, чем среди мужчин ($p < 0,05$; табл. 1). Достоверные различия между показателями женщин и мужчин для каждого из маркеров были выявлены в группе лиц 0–17 лет, а для IgG VCA — дополнительно в возрастной группе 18–39 лет ($p < 0,05$).

Анализ частоты выявления маркеров активной ВЭБ-инфекции среди жителей Москвы показал, что всего в 2011–2020 гг. IgM VCA были выявлены у 16,5% обследованных (95% ДИ 16,3–16,7), IgG EA — у 17,8% (95% ДИ 17,5–18,1), что достоверно ($p < 0,05$) выше, чем аналогичный показатель для IgM VCA. При этом число лиц, обследованных на IgG EA (82 556 человек), было в 2 раза меньше, чем на IgM VCA (161 285 человек).

Достоверно ($p < 0,05$) реже других маркеров активной ВЭБ-инфекции выявлялась ДНК вируса в крови — 4,2% (95% ДИ 4,0–4,4). Генетический материал вируса в слюне (35,5%; 95% ДИ 34,7–36,3) выявлялся достоверно ($p < 0,05$) чаще, нежели в крови, и достоверно чаще серологических маркеров активной ВЭБ-инфекции.

В динамике по годам изменения частоты выявления IgM VCA на 100 обследованных лиц и показателей заболеваемости ИМ (2011–2020 гг.) не были синхронными ($r = 0,32$ — слабая прямая незначимая связь). В то же время между заболеваемостью ИМ и частотами выявления IgG EA в 2011–2020 гг. и ДНК ВЭБ в крови и слюне в 2014–2020 гг. установлена значимая сильная прямая корреляционная зависимость ($r = 0,85$; $0,73$ и $0,89$ соответственно).

Таблица 1. Суммарные уровни серопревалентности IgG VCA и IgG EBNA среди мужчин и женщин разных возрастных групп, проживающих в г. Москве в 2014–2020 гг., % (95% ДИ)

Table 1. Overall VCA IgG and EBNA IgG seroprevalence rates among men and women from different age groups residing in Moscow during 2014–2020, % (95% CI)

Возраст, лет Age, years	Маркер Marker	Мужчины Men	Женщины Women	Совокупный контингент Total contingent
0–17	IgG VCA	53,4% (52,9–54,0)	56,2% (55,6–56,7)	54,9% (54,5–55,3)
	IgG EBNA	47,3% (46,8–47,9)	51,3% (50,7–51,8)	48,8% (48,5–49,2)
18–39	IgG VCA	93,7% (93,3–94,2)	95,7% (95,4–95,9)	95,0% (94,8–95,2)
	IgG EBNA	91,6% (90,1–93,1)	93,0% (92,7–93,3)	92,6% (92,3–92,9)
40–59	IgG VCA	96,6% (96,1–97,0)	96,9% (96,6–97,2)	96,8% (96,5–97,1)
	IgG EBNA	94,0% (93,4–94,6)	92,7% (92,2–93,1)	93,2% (92,9–93,5)
≥60	IgG VCA	96,4% (95,4–97,4)	97,3% (96,7–97,9)	97,0% (96,5–97,5)
	IgG EBNA	92,6% (91,2–94,0)	91,7% (90,7–92,7)	92,0% (91,2–92,8)
Итого Total	IgG VCA	68,7% (67,5–69,9)	79,9% (79,6–80,2)	74,9% (74,7–75,1)
	IgG EBNA	63,9% (63,5–64,3)	75,6% (75,3–75,9)	70,4% (70,2–70,7)

Обратная сильная значимая корреляционная связь выявлена между показателями заболеваемости ИМ в динамике по месяцам и частотами выявления IgM VCA, IgG EA и ДНК ВЭБ в слюне на 100 обследованных ($r = -0,74$; $r = -0,84$ и $r = -0,83$ соответственно). Прямая средней силы незначимая связь имела место при сопоставлении показателей заболеваемости и частоты выявления ДНК ВЭБ в крови ($r = 0,6$).

Суммарно частота выявления IgM VCA, ДНК ВЭБ в крови и слюне на 100 обследованных в группе женщин была достоверно ниже, чем в группе мужчин (табл. 2). Напротив, IgG EA обнаруживались достоверно чаще у женщин в целом и отдельно в каждой возрастной группе ($p < 0,05$).

Обращает на себя внимание достоверное снижение частоты выявления IgM VCA среди совокупного контингента по мере увеличения возраста

обследованных. Противоположная тенденция имеет место для частоты выявления IgG EA: самый низкий показатель установлен в возрастной группе 0–17 лет, самый высокий — среди лиц 60 лет и старше (различия между показателями во всех возрастных группах достоверны; $p < 0,05$). ДНК ВЭБ в крови выявлялась достоверно чаще среди детей 0–17 лет по сравнению с остальными возрастными группами ($p < 0,05$), между которыми, в свою очередь, различия не были значимыми ($p > 0,05$). Частота выявления ДНК ВЭБ в слюне, напротив, в возрастной группе 0–17 лет была самой низкой ($p < 0,05$).

Обсуждение

В ходе проведённого исследования была выявлена многолетняя и внутригодовая цикличность заболеваемости ИМ на территории г. Москвы.

Таблица 2. Частота выявления маркеров активной ВЭБ-инфекции среди мужчин и женщин разных возрастных групп, проживающих в Москве в 2011–2020 гг., на 100 обследованных (95% ДИ)

Table 2. Detection rates for markers of active EBV infection among men and women from different age groups residing in Moscow during 2011–2020, per 100 examined people (95% CI)

Возраст, лет Age, years	Маркер Marker	Мужчины Men	Женщины Women	Совокупный контингент Total contingent
0–17	IgM VCA	21,0 (20,7–21,3)	24,6 (24,2–25,0)	22,6 (22,3–22,9)
	IgG EA	15,3 (14,9–15,7)	17,0 (16,5–17,5)	16,1 (15,8–16,4)
	ДНК ВЭБ в крови EBV DNA in the blood	6,6 (6,0–7,2)	7,5 (6,8–8,2)	7,0 (6,5–7,5)
	ДНК ВЭБ в слюне EBV DNA in saliva	31,4 (29,9–32,9)	30,4 (28,8–32,0)	30,9 (29,8–32,0)
18–39	IgM VCA	11,3 (10,8–11,8)	10,7 (10,4–11,0)	10,8 (10,5–11,1)
	IgG EA	16,8 (16,0–17,6)	19,3 (18,7–19,9)	18,5 (18,0–19,0)
	ДНК ВЭБ в крови EBV DNA in the blood	2,0 (1,4–2,6)	1,0 (0,7–1,3)	1,4 (1,1–1,7)
	ДНК ВЭБ в слюне EBV DNA in saliva	44,7 (42,1–47,3)	36,2 (34,4–38,0)	39,1 (37,6–40,6)
40–59	IgM VCA	5,0 (4,5–5,5)	6,5 (6,1–5,9)	6,0 (5,7–6,3)
	IgG EA	16,7 (15,5–17,9)	23,9 (22,8–25,0)	21,2 (20,4–22,0)
	ДНК ВЭБ в крови EBV DNA in the blood	1,4 (0,7–2,1)	0,7 (0,4–1,0)	1,0 (0,7–1,3)
	ДНК ВЭБ в слюне EBV DNA in saliva	48,9 (45,2–52,6)	36,5 (33,9–39,1)	40,8 (38,7–42,9)
≥60	IgM VCA	5,6 (4,4–6,8)	4,2 (3,5–4,9)	4,7 (4,1–5,3)
	IgG EA	22,5 (19,6–25,4)	28,9 (26,8–31,0)	26,8 (25,0–28,6)
	ДНК ВЭБ в крови EBV DNA in the blood	1,5 (0,2–2,8)	2,1 (0,9–3,3)	1,9 (1,0–2,8)
	ДНК ВЭБ в слюне EBV DNA in saliva	50,0 (42,3–57,7)	43,5 (38,6–48,4)	45,4 (41,2–49,6)
Итого Total	IgM VCA	17,1 (16,8–17,4)	16,1 (15,9–16,3)	16,5 (16,3–16,7)
	IgG EA	15,9 (15,5–16,3)	19,3 (19,0–19,6)	17,8 (17,5–18,1)
	ДНК ВЭБ в крови EBV DNA in the blood	4,8 (4,4–5,2)	3,8 (3,5–4,1)	4,2 (4,0–4,4)
	ДНК ВЭБ в слюне EBV DNA in saliva	37,2 (36,0–38,4)	34,2 (33,1–35,3)	35,5 (34,7–36,3)

Более раннее изучение многолетней динамики заболеваемости данной нозологической формой в Москве в 2000–2016 гг. [17], в Пермском крае в 2006–2015 гг. [18], в Саратове в 1996–2009 гг. [14] не выявило циклических закономерностей, что может быть связано как с погрешностями диагностики и регистрации ИМ [23, 24], так и с выбором временного интервала, в течение которого проводилась оценка. В нашем исследовании показано, что период между двумя подъёмами (спадами) заболеваемости ИМ достаточно продолжительный и составляет 9–11 лет, что не позволяет выявить его за малое число лет наблюдений. Необходимо отметить, что наличие многолетних циклов заболеваемости (больших и малых) описано для ряда инфекций [25], в том числе герпесвирусной этиологии [26]. Так, для ветряной оспы в Республике Беларусь характерна периодичность с шагом 32 года — большие циклы, 3 и 9 лет — малые циклы [27]. Продолжение наблюдения за динамикой заболеваемости ИМ в г. Москве, вероятно, позволит выявить наряду с малыми (9–11 лет) большими циклами.

Изучению сезонности ИМ посвящено ограниченное число работ. Рост заболеваемости в осенне-зимне-весенние месяцы описан для Нижнего Новгорода и Санкт-Петербурга [28, 29], весенняя сезонность установлена в Норвегии и Италии [30]. Отечественными исследователями выявлена обратная корреляционная зависимость внутригодовой динамики заболеваемости и температуры наружного воздуха [28]. Ранее сезонный подъём заболеваемости ИМ в холодное время года на территории Москвы был описан авторами данной работы за 2014–2018 гг. [23, 24]. Настоящее исследование охватывает больший временной интервал (2014–2020 гг.), а полученные результаты ещё раз подтверждают наличие выраженного подъёма заболеваемости ИМ с октября по апрель с максимумом в ноябре.

Характерные и описанные другими авторами группы риска по заболеваемости ИМ [14, 18, 20, 21] были выявлены и в ходе настоящего исследования. Так, в возрастных группах 1–2, 3–6, 7–14 и 15–17 лет заболеваемость была достоверно выше, чем среди лиц старше 18 лет и детей до 1 года. Кроме того, именно заболеваемость детского населения определяла общие подъёмы и спады заболеваемости, в то время как средние многолетние уровни заболеваемости взрослого населения в годы с относительно высокими (2009–2013 гг.) и низкими (2014–2018 гг.) показателями достоверно не различались. Такие особенности можно объяснить выявлением в качестве ИМ у лиц старше 18 лет не первичной острой ВЭБ-инфекции, а реактивации хронической инфекции [31], которая не подчиняется общим законам эпидемиологического распространения и требует обособленного учёта и регистрации.

Отличительной особенностью настоящего исследования является параллельный анализ показателей заболеваемости ИМ населения Москвы и результатов обследования значимой выборки населения столицы на наличие маркеров ВЭБ-инфекции за один период времени.

Таким образом, впервые за длительный период времени на выборке более 100 тыс. человек установлены распространённость маркеров ВЭБ-инфекции среди совокупного населения Москвы, динамика изменения частоты их выявления по годам и месяцам и её взаимосвязь с показателями заболеваемости ИМ, более высокая частота реактиваций ВЭБ-инфекции у женщин, особенности выявления маркеров активной ВЭБ-инфекции в зависимости от возраста. Ранее оценка серопревалентности проводилась в ограниченных группах лиц, как правило, имеющих сопутствующие заболевания, численностью до 200 человек [21, 32, 33]. Высказывались предположения о более высокой распространённости ВЭБ-инфекции у женщин, однако ввиду малых выборок обследованных лиц достоверность различий не была установлена [34, 35]. В настоящем исследовании удалось показать не только значимое преобладание частот выявления IgG VCA и IgG EBNA у женщин, но и достоверно более высокую частоту выявления у них IgG EA, являющегося в первую очередь маркером реактивации.

Важную практическую значимость представляют результаты, указывающие на изменение частоты выявления маркеров активной ВЭБ-инфекции в зависимости от возраста и на факт недоучёта роли IgG EA в диагностике ВЭБ-инфекции, особенно у взрослого населения. При достоверно более высокой частоте выявления IgG EA ($p < 0,05$) обследование на наличие данного маркера проводилось в 2 раза реже, чем IgM VCA, который является в первую очередь маркером острой первичной инфекции и достаточно редко выявляется при реактивации [36]. В нашем исследовании это подтверждается отсутствием прямой корреляционной связи показателей многолетней заболеваемости ИМ с частотой выявления IgM VCA и наличием сильной прямой корреляционной зависимости от частоты выявления IgG EA. Сильная обратная корреляционная связь между показателями внутригодовой заболеваемости ИМ и частотой выявления IgG EA объясняется выработкой данного маркера спустя месяц после перенесённой активной ВЭБ-инфекции и присутствием в крови в течение 3–4 мес. Поскольку ВЭБ-инфекция ввиду многообразия клинических проявлений вызывает существенные диагностические трудности, особенно у взрослых пациентов [37], IgG EA являются незаменимым маркером, исследование на наличие которого позволяет установить этиологию процесса. В этой связи для

повышения качества диагностики ВЭБ-инфекции и точности постановки диагноза целесообразно проведение дополнительных обучающих мероприятий с медицинским персоналом и включение данной тематики в программы непрерывного медицинского образования [38].

Выводы

Использование комплексного подхода в изучении ВЭБ-инфекции на территории Москвы позволило установить следующие эпидемиологические особенности:

- распространённость маркеров хронической ВЭБ-инфекции среди населения Москвы составляет 74,9% для IgG VCA и 70,4% для IgG EBNA ($p < 0,05$);
- многолетняя динамика заболеваемости ИМ характеризуется периодичностью с шагом 9–11 лет и имеет сильные прямые значимые корреляционные связи с выявлением маркеров активной ВЭБ-инфекции (IgG EA — $r = 0,85$, ДНК ВЭБ в крови — $r = 0,73$ и ДНК ВЭБ в слюне — $r = 0,89$);
- для внутригодовой динамики заболеваемости ИМ характерно наличие сезонного подъёма в холодный период года с максимальными показателями в октябре, ноябре или феврале, обусловленного выраженным снижением серопревалентности IgG VCA и IgG EBNA (значимая сильная обратная корреляционная связь: $r = -0,8$ и $r = -0,77$ соответственно);
- группами риска по заболеваемости ИМ (первичной инфекцией) являются дети в возрасте 1–17 лет, что подтверждается достоверно более низкой, по сравнению со взрослыми, частотой выявления маркеров хронической ВЭБ-инфекции (IgG VCA и IgG EBNA) и высокой — IgM VCA и ДНК ВЭБ в крови;
- вклад взрослого населения в эпидемический процесс формируется за счёт реактивации хронической ВЭБ-инфекции, что подтверждается достоверным снижением частоты выявления маркеров острой первичной инфекции (IgM VCA и ДНК ВЭБ в крови) на фоне достоверного роста частоты выявления IgG EA, ДНК ВЭБ в слюне, а также IgG VCA и IgG EBNA по мере увеличения возраста обследованных;
- инфицирование лиц женского пола ВЭБ происходит раньше, а реактивация хронической инфекции встречается чаще, чем у мужчин, что подтверждается достоверно более высокими показателями выявления у первых IgG VCA и IgG EBNA в группе 0–17 лет и IgG EA во всех возрастных группах ($p < 0,05$);
- IgG EA, являясь маркером активной ВЭБ-инфекции, свидетельствуют в первую очередь о наличии реактивации, поскольку достоверно чаще

выявляются у взрослого населения; его внедрение в лабораторную практику позволит повысить этиологическую расшифровку патологических состояний, сопряжённых с ВЭБ-инфекцией.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Dunmire S.K., Verghese P.S., Balfour H.H. Jr. Primary Epstein-Barr virus infection. *J. Clin. Virol.* 2018; 102: 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.03.001>
2. Kerr J.R. Epstein-Barr virus (EBV) reactivation and therapeutic inhibitors. *J. Clin. Pathol.* 2019; 72(10): 651–8. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2019-205822>
3. Cederberg L.E., Rabinovitch M.D., Grimm-Geris J.M., Schmeling D.O., Filtz E.A., Condon L.M., et al. Epstein-Barr virus DNA in parental oral secretions: a potential source infection for their young children. *Clin. Infect. Dis.* 2019; 68(2): 306–12. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy464>
4. Афонасьева Т.М. Значение Эпштейна-Барр вирусной инфекции в патологии беременности. Перинатальное инфицирование плода. *Здоровье и образование в XXI веке.* 2017; 19(11): 13–7.
5. Allen U.D., Preiksaitis J.K. Transplant lymphoproliferative disorders, Epstein-Barr virus infection, and disease in solid organ transplantation: Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. AST Infectious Diseases Community of Practice. *Clin. Transplant.* 2019; 33(9): e13652. <https://doi.org/10.1111/ctr.13652>
6. Чеботкевич В.Н., Кайтанджан Е.И., Волкова С.Д., Кирьянова Г.Ю., Бурyleв В.В., Царапкин И.М. Герпесвирусные инфекции и проблемы инфекционной безопасности гемотрансфузий у иммуносупрессивных больных. *Трансфузиология.* 2012; 13(1): 22–41.
7. Соломай Т.В., Семененко Т.А., Каражас Н.В., Рыбалкина Т.Н., Корниенко М.Н., Бошняк Р.Е. и др. Оценка риска инфицирования герпесвирусами при переливании донорской крови и ее компонентов. *Анализ риска здоровью.* 2020; (2): 135–42. <https://doi.org/10.21668/health.risk/2020.2.15>
8. Dunmire S.K., Grimm J.M., Schmeling D.O., Balfour H.H., Hogquist K.A. The Incubation period of primary Epstein-Barr virus infection: viral dynamics and immunologic events. *PLoS Pathog.* 2015; 11(12): e1005286. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005286>
9. Соломай Т.В., Семененко Т.А., Иванова М.Ю. Роль Эпштейна-Барр вирусной инфекции и гепатитов В и С в патологии печени. *Вопросы вирусологии.* 2019; 64(5): 215–20. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-5-215-220>
10. Соломай Т.В., Семененко Т.А., Филатов Н.Н., Колбутова К.Б., Олейникова Д.Ю., Каражас Н.В. Роль детей и взрослых как резервуара возбудителей в период сезонного подъема заболеваемости инфекциями верхних дыхательных путей. *Детские инфекции.* 2020; 19(3): 5–11. <https://doi.org/10.22627/2072-8107-2020-19-3-5-11>
11. Kempkes B., Robertson E.S. Epstein-Barr virus latency: current and future perspectives. *Curr. Opin. Virol.* 2015; 14: 138–44. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.09.007>
12. Mehta S.K., Bloom D.C., Plante I., Stowe R., Feiveson A.H., Renner A., et al. Reactivation of latent Epstein-Barr virus: a comparison after exposure to gamma, proton, carbon, and iron radiation. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19(10): 2961. <https://doi.org/10.3390/ijms19102961>
13. Buschle A., Hammerschmidt W. Epigenetic lifestyle of Epstein-Barr virus. *Semin. Immunopathol.* 2020; 42(2): 131–42. <https://doi.org/10.1007/s00281-020-00792-2>

14. Хмилевская С.А., Зайцева И.А. Клинико-эпидемиологические аспекты инфекционного мононуклеоза у детей. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2010; (5): 45–50.
15. Соломай Т.В., Семенов Т.А. Вирусные гепатиты В, С и инфекционный мононуклеоз: эпидемиологическое сходство и различия. *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(1): 27–34. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-27-34>
16. Соломай Т.В. Многолетняя динамика заболеваемости и территориальное распространение инфекционного мононуклеоза. *Здравоохранение Российской Федерации*. 2019; 63(4): 186–92. <https://doi.org/10.18821/0044-197X-2019-63-4-186-192>
17. Михнева С.А., Гришина Ю.Ю., Кухтевич Е.В., Мартынов Ю.В. Инфекционный мононуклеоз: характеристика проявлений эпидемического процесса. *Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение*. 2017; (5): 61–4.
18. Постаногова Н.О., Софронова Л.В., Фельдблюм И.В., Рысинская Т.К. Эпидемическая ситуация по инфекционному мононуклеозу у детей в Пермском крае. *Медицинский альманах*. 2017; (2): 47–9.
19. Семенов Т.А., Акимкин В.Г. Сероэпидемиологические исследования в системе надзора за вакциноуправляемыми инфекциями. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2018; (2): 87–94. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-2-87-94>
20. Winter J.R., Taylor G.S., Thomas O.G., Jackson C., Lewis J.E.A., Stagg H.R. Predictors of Epstein–Barr virus serostatus in young people in England. *BMC Infect. Dis.* 2019; 19(1): 1007. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4578-y>
21. Зыкова Т.А., Кит О.И., Росторгуев Э.Е., Шевякова Е.А., Кузнецова Н.С. Серопревалентность к герпесвирусам среди больных с первичными глиомами головного мозга. *Исследования и практика в медицине*. 2019; 6(4): 45–53. <https://doi.org/10.17709/2409-2231-2019-6-4-4>
22. Палтышев И.П., Герасимов А.Н. Методика определения сроков начала и окончания сезонных подъемов. В кн.: *Тезисы докладов конференции «Теоретические проблемы эпидемиологии и иммунологии»*. Нальчик; 1986: 52–5.
23. Соломай Т.В., Филатов Н.Н. Сезонность инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр. *Журнал инфектологии*. 2020; 12(4): 93–100. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2020-12-4-93-100>
24. Соломай Т.В., Филатов Н.Н., Каира А.Н., Лавров В.Ф., Кузин А.А., Ланцов Е.В. Сходство проявлений эпидемических процессов инфекционного мононуклеоза и инфекций верхних дыхательных путей. *Вестник Российской Военно-медицинской академии*. 2020; (3): 46–51.
25. Брико Н.И., Миндлина А.Я., Полибин Р.В. Универсальность изменений в проявлениях эпидемического процесса антропонозных инфекций за последние десятилетия. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2015; 92(5): 12–20.
26. Парфенова Н.П., Дмитриева Г.М., Орешкина Н.Д. Основные закономерности эпидемического процесса ветряной оспы в Красноярском крае (2000–2011 гг.). *Инфекция и иммунитет*. 2012; 2(1–2).
27. Чистенко Г.Н., Гузовская Т.С., Шиманович В.П. Закономерности эпидемического процесса ветряной оспы на территории Республики Беларусь. *Журнал Гродненского государственного медицинского университета*. 2008; (2): 68–71.
28. Филатова Е.Н., Солнцев Л.А., Уткин О.В. Влияние сезонных факторов на динамику уровня заболеваемости инфекционным мононуклеозом в разных возрастных группах (на примере Нижнего Новгорода). *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2017; 22(2): 79–85. <https://doi.org/10.18821/1560-9529-2017-22-2-79-85>
29. Дихтярева А.И., Булыгина В.В., Сальников О.В. Основные статистические показатели заболеваемости инфекционным мононуклеозом ВЭБ этиологии на примере инфекционного отделения СПб ГПМУ в период с 2013 по 2017 гг. *FORCIPE*. 2019; 2(S): 441–2.
30. Lossius A., Riise T., Pugliatti M., Bjørnevik K., Casetta I., Drulovic J., et al. Season of infectious mononucleosis and risk of multiple sclerosis at different latitudes; the EnvIMS Study. *Mult. Scler.* 2014; 20(6): 669–74. <https://doi.org/10.1177/1352458513505693>
31. Kawamoto K., Miyoshi H., Seto M., Kimura H., Ohshima K. Clinical features of adult-onset chronic active Epstein–Barr virus infection. *Rinsho Ketsueki*. 2019; 60(8): 944–52. <https://doi.org/10.11406/rinketsu.60.944> (in Japanese)
32. Алимбарова Л.М., Лазаренко А.А., Львов Н.Д., Баринский И.Ф. Спектр маркеров герпесвирусных инфекций и алгоритм их лабораторной диагностики у детей с воспалительными процессами верхних дыхательных путей и ЛОР-органов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(3): 182–8. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-3-182-188>
33. Бошняк Р.Е., Каражас Н.В., Рыбалкина Т.Н., Калугина М.Ю., Феклисова Л.В., Савицкая Н.А. Выявление маркеров Эпштейна–Барр вирусной инфекции у детей с различной патологией. *Детские инфекции*. 2011; 10(3): 64–6.
34. Trastoy Pena R., Costa Alcalde J.J., Rodríguez Calviño J., Navarro de la Cruz D., BarbeitoCastiñeiras G., Aguilera Guirao A. Infection by the Epstein–Barr virus between the years 2006–2015 in the health area of Santiago de Compostela. Relationship with age and sex. *Rev. Esp. Quimioter.* 2017; 30(6): 468–71. (in Spanish)
35. Pourahamad M., Hooshmand F., OlyaeNezhad S., Sepidkar A. EBV seroepidemiology in married and unmarried women and men in Iran. *Rep. Biochem. Mol. Biol.* 2014; 2(2): 94–7.
36. Демина О.И., Тихомиров Д.С., Чеботарёва Т.А., Мазанкова Л.Н., Туполева Т.А. Клиническая значимость вирусологических методов верификации этиологии инфекционного мононуклеоза. *Детские инфекции*. 2020; 19(2): 29–37. <https://doi.org/10.22627/2072-8107-2020-19-2-29-37>
37. Суздальцева Н.А., Валишин Д.А. Иммунопатогенетические варианты Эпштейна–Барр-вирусной инфекции. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2020; 9(4): 88–91. <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2020-9-4-88-91>
38. Соломай Т.В., Куликова М.М. Осведомленность врачей об инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр. *Санитарный врач*. 2019; (7): 30–41.

REFERENCES

1. Dunmire S.K., Verghese P.S., Balfour H.H. Jr. Primary Epstein–Barr virus infection. *J. Clin. Virol.* 2018; 102: 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.03.001>
2. Kerr J.R. Epstein–Barr virus (EBV) reactivation and therapeutic inhibitors. *J. Clin. Pathol.* 2019; 72(10): 651–8. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2019-205822>
3. Cederberg L.E., Rabinovitch M.D., Grimm-Geris J.M., Schmeling D.O., Filtz E.A., Condon L.M., et al. Epstein–Barr virus DNA in parental oral secretions: a potential source infection for their young children. *Clin. Infect. Dis.* 2019; 68(2): 306–12. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy464>
4. Afonasyeva T.M. The meaning of Epstein–Barr virus infection in pregnancy pathology. Perinatal infection of the fetus. *Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke*. 2017; 19(11): 13–7. (in Russian)
5. Allen U.D., Preiksaitis J.K. Transplant lymphoproliferative disorders, Epstein–Barr virus infection, and disease in solid organ transplantation: Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. AST Infectious Diseases Community of Practice. *Clin. Transplant.* 2019; 33(9): e13652. <https://doi.org/10.1111/ctr.13652>
6. Chebotkevich V.N., Kaytanzhan E.I., Volkova S.D., Kir'yanova G.Yu., Burylev V.V., Tsarapkin I.M. Herpesvirus infections

- and the problems of infectious safety of haemotransfusions in immunosuppressed patients (review). *Transfuziologiya*. 2012; 13(1): 22–41. (in Russian)
7. Solomay T.V., Semenenko T.A., Karazhas N.V., Rybalkina T.N., Kornienko M.N., Bosh'yan R.E., et al. Assessing risks of infection with herpes viruses during transfusion of donor blood and its components. *Analiz riska zdorov'yu*. 2020; (2): 135–42. <https://doi.org/10.21668/health.risk/2020.2.15>
 8. Dunmire S.K., Grimm J.M., Schmelting D.O., Balfour H.H., Hogquist K.A. The Incubation period of primary Epstein–Barr virus infection: viral dynamics and immunologic events. *PLoS Pathog*. 2015; 11(12): e1005286. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005286>
 9. Solomay T.V., Semenenko T.A., Ivanova M.Yu. The role of Epstein–Barr viral infection and hepatitis B and C in liver pathology. *Voprosy virusologii*. 2019; 64(5): 215–20. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-5-215-220> (in Russian)
 10. Solomay T.V., Semenenko T.A., Filatov N.N., Kolbutova K.B., Oleynikova D.Yu., Karazhas N.V. The role of children and adults as a reservoir of pathogens during the seasonal rise in the incidence of upper respiratory tract infections. *Detskie infektsii*. 2020; 19(3): 5–11. <https://doi.org/10.22627/2072-8107-2020-19-3-5-11> (in Russian)
 11. Kempkes B., Robertson E.S. Epstein–Barr virus latency: current and future perspectives. *Curr. Opin. Virol*. 2015; 14: 138–44. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.09.007>
 12. Mehta S.K., Bloom D.C., Plante I., Stowe R., Feiveson A.H., Renner A., et al. Reactivation of latent Epstein–Barr virus: a comparison after exposure to gamma, proton, carbon, and iron radiation. *Int. J. Mol. Sci*. 2018; 19(10): 2961. <https://doi.org/10.3390/ijms19102961>
 13. Buschle A., Hammerschmidt W. Epigenetic lifestyle of Epstein–Barr virus. *Semin. Immunopathol*. 2020; 42(2): 131–42. <https://doi.org/10.1007/s00281-020-00792-2>
 14. Khmylevskaya S.A., Zaytseva I.A. Clinical and epidemiologic aspects of infectious mononucleosis in children. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika*. 2010; (5): 45–50. (in Russian)
 15. Solomay T.V., Semenenko T.A. Viral hepatitis B, C and infectious mononucleosis: epidemiological similarities and differences. *Voprosy virusologii*. 2020; 65(1): 27–34. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-27-34> (in Russian)
 16. Solomay T.V. Dynamics of morbidity and territorial spread of infectious mononucleosis. *Zdravookhranenie Rossiyskoy Federatsii*. 2019; 63(4): 186–92. <https://doi.org/10.18821/0044-197X-2019-63-4-186-192> (in Russian)
 17. Mikhneva S.A., Grishina Yu.Yu., Kukhtevich E.V., Martynov Yu.V. Infectious mononucleosis: characteristics of the manifestations of the epidemic process. *Infektsionnye bolezni: Novosti. Mneniya. Obuchenie*. 2017; (5): 61–4. (in Russian)
 18. Postanogova N.O., Sofronova L.V., Fel'dblyum I.V., Rysinskaya T.K. Epidemic situation in infectious mononucleosis of children in Perm region. *Meditsinskiy al'manakh*. 2017; (2): 47–9. (in Russian)
 19. Semenenko T.A., Akimkin V.G. Seroepidemiology in the surveillance of vaccine-preventable diseases. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2018; (2): 87–94. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-2-87-94> (in Russian)
 20. Winter J.R., Taylor G.S., Thomas O.G., Jackson C., Lewis J.E.A., Stagg H.R. Predictors of Epstein–Barr virus serostatus in young people in England. *BMC Infect. Dis*. 2019; 19(1): 1007. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4578-y>
 21. Zykova T.A., Kit O.I., Rostorguev E.E., Shevyakova E.A., Kuznetsova N.S. Seroprevalence to herpesviruses among patients with primary brain gliomas. *Issledovaniya i praktika v meditsine*. 2019; 6(4): 45–53. <https://doi.org/10.17709/2409-2231-2019-6-4-4> (in Russian)
 22. Paltyshev I.P., Gerasimov A.N. Methodology for determining the timing of the beginning and end of seasonal rises. In: *Abstracts of the Conference Reports «Theoretical Problems of Epidemiology and Immunology» [Tezisy dokladov konferentsii «Teoreticheskie problemy epidemiologii i immunologii»]*. Nal'chik; 1986: 52–5. (in Russian)
 23. Solomay T.V., Filatov N.N. Seasonality of infection caused by Epstein–Barr virus. *Zhurnal infektologii*. 2020; 12(4): 93–100. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2020-12-4-93-100> (in Russian)
 24. Solomay T.V., Filatov N.N., Kaira A.N., Lavrov V.F., Kuzin A.A., Lantsov E.V. Similarity of manifestations of epidemic processes of infectious mononucleosis and upper respiratory tract infections. *Vestnik Rossiyskoy VoЕННО-meditsinskoy akademii*. 2020; (3): 46–51. (in Russian)
 25. Briko N.I., Mindlina A.Ya., Polibin R.V. Universality of changes in epidemic process manifestations of anthroponosis infections in recent decades. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2015; 92(5): 12–20. (in Russian)
 26. Parfenova N.P., Dmitrieva G.M., Oreshkina N.D. The main patterns of the epidemic process of chicken pox in the Krasnoyarsk Territory (2000–2011). *Infektsiya i immunitet*. 2012; 2(1-2). (in Russian)
 27. Chistenko G.N., Guzovskaya T.S., Shimanovich V.P. Peculiarities of varicella epidemic process on the territory of the Republic of Belarus. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2008; (2): 68–71. (in Russian)
 28. Filatova E.N., Solntsev L.A., Utkin O.V. The impact of seasonal factors on the dynamics of incidence rate of infectious mononucleosis in different age groups (on the example of Nizhny Novgorod). *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 2017; 22(2): 79–85. <https://doi.org/10.18821/1560-9529-2017-22-2-79-85> (in Russian)
 29. Dikhtyareva A.I., Bulygina V.V., Sal'nikov O.V. Basic statistical indicators of the incidence of infectious mononucleosis of EB etiology on the example of the infectious department of St. Petersburg State Medical University in the period from 2013 to 2017. *FORCIPE*. 2019; 2(S): 441–2. (in Russian)
 30. Lossius A., Riise T., Pugliatti M., Bjørnevik K., Casetta I., Drulovic J., et al. Season of infectious mononucleosis and risk of multiple sclerosis at different latitudes; the EnvIMS Study. *Mult. Scler*. 2014; 20(6): 669–74. <https://doi.org/10.1177/1352458513505693>
 31. Kawamoto K., Miyoshi H., Seto M., Kimura H., Ohshima K. Clinical features of adult-onset chronic active Epstein–Barr virus infection. *Rinsho Ketsueki*. 2019; 60(8): 944–52. <https://doi.org/10.11406/rinketsu.60.944> (in Japanese)
 32. Alimbarova L.M., Lazarenko A.A., L'vov N.D., Barinskiy I.F. The spectrum of markers of Herpes viral infections and algorithm of their laboratory diagnostic in children with inflammatory processes of upper respiratory ways and ENT-organs. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2017; 62(3): 182–8. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-3-182-188> (in Russian)
 33. Bosh'yan R.E., Karazhas N.V., Rybalkina T.N., Kalugina M.Yu., Feklisova L.V., Savitskaya N.A. Detection of markers of Epstein–Barr virus infection in children with different pathologies. *Detskie infektsii*. 2011; 10(3): 64–6. (in Russian)
 34. Trastoy Pena R., Costa Alcalde J.J., Rodríguez Calviño J., Navarro de la Cruz D., BarbeitoCastiñeiras G., Aguilera Guirao A. Infection by the Epstein–Barr virus between the years 2006–2015 in the health area of Santiago de Compostela. Relationship with age and sex. *Rev. Esp. Quimioter*. 2017; 30(6): 468–71. (in Spanish)
 35. Pourahamad M., Hooshmand F., Olyaei-Nezhad S., Sepidkar A. EBV seroepidemiology in married and unmarried women and men in Iran. *Rep. Biochem. Mol. Biol*. 2014; 2(2): 94–7.

36. Demina O.I., Tikhomirov D.S., Chebotareva T.A., Mazankova L.N., Tupoleva T.A. Clinical relevance of virological verification methods for the etiology of infectious mononucleosis. *Detskii infektsii*. 2020; 19(2): 29–37. <https://doi.org/10.22627/2072-8107-2020-19-2-29-37> (in Russian)
37. Suzdal'tseva N.A., Valishin D.A. Immunopathogenetic options of Epstein–Barr virus infection. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie*. 2020; 9(4): 88–91. <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2020-9-4-88-91> (in Russian)
38. Solomay T.V., Kulikova M.M. Physicians' awareness of Epstein–Barr virus infection. *Sanitarnyy vrach*. 2019; (7): 30–41. (in Russian)

Информация об авторах

Соломай Татьяна Валерьевна[✉] — к.м.н., зам. руководителя Межрегионального управления № 1 ФМБА России, Москва, Россия; с.н.с. лаб. эпидемиологического анализа и мониторинга инфекционных заболеваний НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, solomay@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7040-7653>

Семеновна Татьяна Анатольевна — д.м.н., профессор, руководитель отдела эпидемиологии НИЦЭИМ им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия; профессор каф. инфектологии и вирусологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6686-9011>

Тутельян Алексей Викторович — д.м.н., член-корреспондент РАН, зав. лаб. инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия; профессор каф. эпидемиологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2706-6689>

Боброва Мария Витальевна — аспирант 3-го года обучения Национального НИИ общественного здоровья имени Н.А. Семашко, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0711-0686>

Участие авторов. Концепция и дизайн исследования — Соломай Т.В., Семеновна Т.А.; подбор материала и статистическая обработка — Соломай Т.В., Тутельян А.В., Боброва М.В.; написание текста — Соломай Т.В., Семеновна Т.А., Тутельян А.В.; редактирование — Семеновна Т.А.; утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи — Соломай Т.В., Семеновна Т.А.

Статья поступила в редакцию 10.07.2021;
принята к публикации 28.09.2021;
опубликована 25.12.2021

Information about the authors

Tatyana V. Solomay[✉] — Cand. Sci. (Med.), Deputy Head, Interregional Department No. 1 of the FMBA of Russia, Moscow, Russia; senior researcher, Laboratory of epidemiological analysis and monitoring of infectious diseases, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, solomay@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7040-7653>

Tatiana A. Semenenko — D. Sci. (Med.), Professor, Head, Department of epidemiology, National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia; Professor, Department of infectology and virology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6686-9011>

Aleksey V. Tutelyan — D. Sci. (Med.), Professor, Corresponding member of the Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of infections associated with health care, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia; Professor, Department of epidemiology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2706-6689>

Maria V. Bobrova — postgraduate student, Semashko National Research Institute of Public Health, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0711-0686>

Author contribution. Concept and design of the study — Solomay T.V., Semenenko T.A.; material selection and statistical processing — Solomay T.V., Tutelyan A.V., Bobrova M.V.; text writing — Solomay T.V., Semenenko T.A., Tutelyan A.V.; editing — Semenenko T.A.; approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article — Solomay T.V., Semenenko T.A.

The article was submitted 10.07.2021;
accepted for publication 28.09.2021;
published 25.12.2021



Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using next generation sequencing and Mykrobe software

Vladimir Tolchkov¹✉, Yordan Hodzhev¹, Borislava Tsafarova¹, Elizabeta Bachiyiska¹, Yuliana Atanasova¹, Ana Baykova¹, Stanislava Yordanova¹, Alberto Trovato², Daniela Cirillo², Stefan Panaiotov¹

¹Department of Microbiology, National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria

²WHO Collaborating Centre and TB Supranational Reference Laboratory San Raffaele Scientific Institute, Milano, Italy

Abstract

Introduction. *Mycobacterium tuberculosis* is the causative agent of tuberculosis. Drug susceptibility testing is performed by phenotypic and molecular tests. Commonly used for phenotypic drug susceptibility testing is the automated BACTEC system in a liquid culture medium. Drug susceptibility by line probe molecular tests was introduced almost 15 years ago. Recently whole genome sequencing (WGS) analysis of *M. tuberculosis* strains demonstrated that genotyping of drug-resistance could be accurately performed. Several software tools were developed.

Our study aimed to perform whole-genome sequencing on phenotypically confirmed multi-drug resistant (MDR) *M. tuberculosis* strains, to identify drug-resistant mutations and to compare whole-genome sequencing profiles with line probe assay and phenotypic results.

Materials and methods. We performed analysis on 34 MDR *M. tuberculosis* Bulgarian strains. Phenotypic drug susceptibility testing was performed on the BACTEC system. For molecular testing of drug susceptibility to first- and second-line tuberculostatics, we applied line probe assay Geno Type MTBDR *plus* v.1.0 и Geno Type MTBDR *sl* v.1.0. Sequencing was performed on MiSeq. Generated FASTQ files were analyzed for known drug-resistant mutations with the software platform Mykrobe v.0.8.1.

Results. All three methods — phenotypic analysis using the BACTEC system, genetic analysis of strains applying the Geno Type test and Mykrobe software gave comparable sensitivity/resistance results for the studied strains. All phenotypically proven rifampicin and isoniazid-resistant strains were 100% confirmed using Mykrobe software. The C-15T mutation is a marker for isoniazid resistance in strains of the SIT41 spoligotype. We observed a 75% (21/28) agreement between BACTEC and Mykrobe for ethambutol resistance. Phenotypically, 87% ($n = 27$) of the strains are resistant to streptomycin, but only 59% ($n = 19$) are proven by Mykrobe software. Comparing phenotypic and genotypic resistance to ofloxacin, amikacin and kanamycin, we observed 100% coincidence of results.

Conclusions. Whole-genome sequencing approach is relatively expensive and laborious but useful for detailed analysis such as epidemiological genotyping and molecular drug susceptibility testing.

Keywords: *M. tuberculosis*, FASTQ, next-generation sequencing, drug resistance

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ministry of Health of the Republic of Bulgaria (Protocol No. 7, August 2, 2019 on the conditions and procedures for conducting diagnosis, prevention and control of tuberculosis).

Funding source. This research was funded by the Bulgarian National Science Fund (grants numbers ДН13/4-15.12.2017 and ДН13/1-14.12.2017).

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

For citation: Tolchkov V., Hodzhev Y., Tsafarova B., Bachiyiska E., Atanasova Yu., Baykova A., Yordanova S., Trovato A., Cirillo D., Panaiotov S. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using next generation sequencing and Mykrobe software. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(6):697–705.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-191>

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-191>

Определение чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* к противотуберкулёзным препаратам с помощью полногеномного секвенирования и программного обеспечения «Mykrobe»

Vladimir Tolchkov¹✉, Yordan Hodzhev¹, Borislava Tsafarova¹, Elizabeta Bachiyska¹, Yuliana Atanasova¹, Ana Baykova¹, Stanislava Yordanova¹, Alberto Trovato², Daniela Cirillo², Stefan Panaiotov¹

¹Department of Microbiology, National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria

²WHO Collaborating Centre and TB Supranational Reference Laboratory San Raffaele Scientific Institute, Milano, Italy

Аннотация

Введение. Чувствительность *Mycobacterium tuberculosis* к противотуберкулёзным препаратам устанавливается с помощью фенотипических и молекулярных методов. Анализ целого генома штаммов *M. tuberculosis* даёт возможность предсказывать резистентность к лекарствам для большого числа медикаментов. Для этого разработано несколько видов программного обеспечения.

Цель работы — определить чувствительность *M. tuberculosis* к антиотуберкулёзным препаратам с помощью фенотипического и генотипического анализа, а также полногеномного секвенирования с использованием программного обеспечения «Mykrobe».

Материалы и методы. Исследовали 34 мультирезистентных штамма *M. tuberculosis*, выделенных из клинических материалов 34 пациентов в Болгарии. Все они были подтверждены фенотипически с помощью «BACTEC MGIT 960 System». Для определения резистентности к противотуберкулёзным средствам первого и второго ряда пользовались тестами для линейной гибридизации «Geno Type MTBDR *plus* v.1.0» и «Geno Type MTBDR *sl* v.1.0». Штаммы *M. tuberculosis* секвенировали с помощью «MiSeq». Для электронной резистогаммы применяли программное обеспечение «Mykrobe v.0.8.1».

Результаты. Все три метода — фенотипический анализ, генетический анализ и электронная резистогамма с помощью программного обеспечения «Mykrobe» — дали сопоставимые результаты чувствительности/резистентности исследуемых штаммов. Все фенотипически доказанные штаммы, резистентные к рифампицину и изониазиду, были подтверждены на 100% с помощью программного обеспечения «Mykrobe». Мутация C-15T является маркером для резистентности к изониазиду у исследуемых нами штаммов со сполиготипом SIT41. Мы наблюдали 75% (21/28) совпадения результатов по «BACTEC» и «Mykrobe» в отношении резистентности к этамбутолу. Фенотипически 87% ($n = 27$) штаммов были устойчивы к стрептомицину, и лишь 59% ($n = 19$) доказаны программным обеспечением «Mykrobe» как таковые. Сравнивая фенотипическую и генотипическую резистентность к офлоксацину, амикацину и канамицину, мы наблюдали совпадение результатов на 100%.

Выводы. Секвенирование целого генома относительно дорого и трудоёмко, но представляет собой ценный инструмент эпидемиологического генотипирования и определения восприимчивости к лекарственным средствам.

Ключевые слова: *M. tuberculosis*, FASTQ, секвенирование следующего поколения, лекарственная резистентность

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Министерством здравоохранения Республики Болгария (Постановление № 7 от 02.08.2019 об условиях и процедурах проведения диагностики, профилактики и борьбы с туберкулезом).

Источник финансирования. Исследование финансировалось Болгарским национальным научным фондом (гранты № ДН13 / 4-15.12.2017 и ДН13 / 1-14.12.2017).

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

Для цитирования: Tolchkov V., Hodzhev Y., Tsafarova B., Bachiyska E., Atanasova Yu., Baykova A., Yordanova S., Trovato A., Cirillo D., Panaiotov S. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using next generation sequencing and Mykrobe software. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(6):697–705. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-191>

Introduction

Drug resistance is a serious problem challenging antimicrobial therapy around the world¹. Treatment of tuberculosis patients with antituberculosis drugs is one of the main strategies for disease control in Bulgaria and worldwide [1–4]. *Mycobacterium tuberculosis* infection and resistance in some cases is associated with coinfection like HIV [5–7], and this fact should be taken into account when therapy is subscribed. Antimicrobial drugs gradually lose activity against pathogens as a result of increasing microbial resistance. Along with classical methods of determination of *M. tuberculosis* complex drug resistance, new ones related to DNA sequence assays were recently introduced². PCR and targeted sequencing of genes causing antimicrobial resistance are widely used and became common. The introduction of next-generation sequencing technologies gave to researchers new opportunities for more powerful and detailed analysis [8–11]. Another advantage of NGS analysis is that when a strain once being sequenced, the information could be stored in formats such as FASTQ, FAST5 or others, depending on the technology, this strain can be analyzed in further studies with different software tools for different genetic, phylogenetic and epidemiological investigations. Illumina sequencing technology is widely applied. Soon application of next-generation sequencing technology will be mandatory in the description of bacterial or viral strains and will be widely used in other fields of medicine and will displace many phenotypic and current molecular genetic methods. Software tools were developed for drug resistance determination using data of whole-genome sequenced micro-

organisms, such as ABRicate, ARIBA [12], ARGs-OAP [12], ARG-ANNOT [14], CASTB [15], KvarQ [16], MTBseq [17], PhyResSe [18], RAST [19], ResFinderST [20], RGI [21], SRST2 [22], SSTAR [23], TB Profiler [24] and Mykrobe tested by us [25]. Mykrobe has several advantages in comparison with previous software:

- 1) it has an updated catalogue, increasing the sensitivity for determination of pyrazinamide resistance;
- 2) it allows the users to add their catalogues;
- 3) it has improved identification for non-tuberculosis mycobacterial species.

The Mykrobe software specificity and sensitivity were estimated in a previous study comparing phenotypic and whole-genome sequencing results obtained for 4362 isolates of *M. tuberculosis*. The estimated sensitivity of Mykrobe was 100, 95, 82, 99%, and the specificity is 99, 100, 99, 99% respectively for rifampicin, isoniazid, pyrazinamide, and ethambutol [26]. Mykrobe software is not popular in Bulgaria and has not been applied. The present work aimed to determine the phenotypic and genotypic susceptibility of *M. tuberculosis* to antituberculosis drugs. Tasks of present work included determination of phenotypic susceptibility of *M. tuberculosis* strains isolated from Bulgarian patients, whole-genome sequencing of the strains and application of the software tool “Mykrobe” for drug-susceptibility testing.

Materials and Methods

This study includes 34 multi-resistant *M. tuberculosis* (MDR-TB) strains isolated from 34 Bulgarian patients' samples; out of them 9 were isolated in 2009, 23 — in 2010, and 2 strains were isolated in 2011. Their resistance has been phenotypically confirmed by BACTEC MGIT 960 System. The genotypic resistance for most of them was determined by the line probe assay (LPA) (71% of them were tested for first-line drugs and 21% were tested for second-line drugs) at the National Reference Laboratory of tuberculosis, NCIPD.

Isolation of M. tuberculosis strains from clinical samples

The studied clinical materials were processed by homogenization and decontamination, in accordance with the standard operating procedures described in the Methodological instructions for microbiological diagnosis and treatment of tuberculosis (Bulgarian Ministry of Health, 2009). Each sample was inoculated in two tubes Löwenstein–Jensen solid media and one tube with liquid media (Mycobacteria Growth Indicator Tube — MGIT). We used the products of “Becton Dickinson”. The tubes were cultivated at 37°C. The result of cultivation on solid media was evaluated by the scale of semi-quantitative assessment of growth according to the above-mentioned guidelines.

MGIT liquid media tubes had a bar code and a fluorescence sensor on the bottom. The result was automatically generated by BACTEC MGIT 960 system and the Becton Dickinson's software. From the positive

¹ World Health Organization, Geneva. WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 4: treatment — drug-resistant tuberculosis treatment/ World Health Organization 2020.

URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/339991/9789289054966.pdf>

² World Health Organization (2016). The use of molecular line probe assay for the detection of resistance to isoniazid and rifampicin: policy update. World Health Organization.

URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/250586>;
World Health Organization, Geneva. The use of molecular line probe assays for the detection of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs: policy guidance. 2016. WHO/HTM/TB/2016.07.

URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/246131>;
WHO Regional Office for Europe. Expert opinion of the European Tuberculosis Laboratory Initiative core group members for the WHO European Region. Algorithm for laboratory diagnosis and treatment-monitoring of pulmonary tuberculosis and drug-resistant tuberculosis using state-of-the-art rapid molecular diagnostic technologies. 2017.

URL: https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0006/333960/ELI-Algorithm.pdf;

World Health Organization (2013). Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB in adults and children: policy update. World Health Organization.

URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/112472>

test tubes we performed the immunochromatographic test BD MGIT TB Identification Test (“Becton Dickinson”) in order to detect *Mycobacterium tuberculosis* complex. The Drug Sensitivity Tests (DST) was done using BACTEC and Geno Type MTBDR *plus* v.1.0 and Geno Type MTBDR *sl* v.1.0 (“Hain Lifescience”).

Phenotypic DST of *M. tuberculosis* complex to first- and second-line anti-TB drugs

The phenotypic susceptibility of the strains to the following anti-tuberculosis drugs: streptomycin, isoniazid, rifampicin, ethambutol, ofloxacin, amikacin, kanamycin and capreomycin was evaluated by the proportion method using the fully automated BACTEC MGIT 960 system, according the manufacturer's instructions (BACTEC System User Guide MGIT 960, 2004). The tested critical concentrations were as follows: streptomycin — 1.0 µg/ml; isoniazid — 0.1 µg/ml; rifampicin — 1.0 µg/ml; ethambutol — 5.0 µg/ml; ofloxacin — 2.0 µg/ml; amikacin — 1.0 µg/ml; kanamycin — 5.0 µg/ml; capreomycin — 2.5 µg/ml.

Molecular genetic methods for detecting resistance to the first and second line anti-tuberculosis drugs

We used line probe assays (LPA) Geno Type MTBDR *plus* v.1.0 and Geno Type MTBDR *sl* v.1.0 (“Hain Lifescience”) according the manufacturer's instructions. The tests were based on DNA-STRIP technology. Rifampicin resistance was found by detection of a mutation in the *rpoB* gene encoding the β-subunit of RNA polymerase. The resistance to isoniazid was searched in two genes: a mutation in the *katG* gene encoding peroxidase, which causes a high level of resistance, and a mutation in the *inhA* gene encoding enoyl-(acyl-protein carrier) reductase (NADH), causing a low level resistance. Resistance to the fluoroquinolones was detected by GenoType MTBDR *sl*, v.1.0, scoping for mutation in the *gyrA* gene encoding DNA gyrase. The resistance to aminoglycosides and cyclic peptides was detected by proved mutation in the *rrs* gene encoding the 16S rRNA.

DNA isolation

Phenotypically proven multidrug-resistant *M. tuberculosis* strains were grown on Löwenstein–Jensen medium for 35–42 days at 37°C. A full inoculation loop of fresh culture was resuspended in 400 µl TE buffer [10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 7.0)] in a 1.5–2.0 ml screw cap tube. The samples were incubated for 20 min at 80°C for inactivation of mycobacterial culture. DNA was isolated performing method described by van Soolingen and modified by us. [27]. In each tube to the lysozyme was added 1U RNase H followed by incubation for 4 h at 37°C than 70 µl of 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) and 10 µl proteinase K at a concentration of 10 mg/ml were added and tubes were incubated for 24 h at 65°C. All other steps were

performed following the original methodology. DNA quality was checked spectrophotometrically at optical density 1.8–1.9 OD measured on 260/280 nm.

Strain sequencing and bioinformatic analysis

Whole genomes of 34 *M. tuberculosis* resistant strains collected by the Bulgarian National Reference Laboratory of Tuberculosis were sequenced at the Supranational Reference Laboratory of Tuberculosis, San Raffaele Institute, Milan, Italy. Sequencing results were provided as FASTQ files written in fasta.qz format. Information about the whole genome of each strain was stored in two files: one with the amplicons ordered in 5' → 3' direction, and a second ordered in 3' → 5'. The majority of the amplicons were 117 bp in size without adapter regions on both ends. Bacterial genome size was about 4.5 million base pairs. The size of each file containing genome data was about 250 MB. We installed Mykrobe software (www.mykrobe.com), version v.0.8.1 for desktop under Windows 10 [28] which is freely available for non-commercial use to analyze genome sequences. We loaded pair of readings sequenced in both directions. After overlaying of fragments on the catalogues used by Mykrobe offline, containing information about the genes determining drug resistance, drug resistance and related gene mutations were presented in a tabular form. The agreement between resistant phenotypic cultural method and Mykrobe software prediction tool was illustrated by Venn diagram³ for each tuberculostatic. Reference vaccine strain BCG SL222 Sofia [29], originating from Russian vaccine strains BCG-I seed lot 374(a) was used as a negative reference control.

Results and Discussion

We determined the drug-susceptibility of 34 strains of *M. tuberculosis* collected at the National Reference Laboratory of Tuberculosis, NCIPD, Sofia, Bulgaria. All investigated strains were MDR, and in two of them, we proved extensive drug resistance (XDR). The phenotypic and genotypic drug resistance of strains is shown in **Table**.

Designations of strains are shown in the first column of Table. All phenotypically proven rifampicin and isoniazid-resistant strains were 100% confirmed by Mykrobe software. In thirty-one strains, rifampicin resistance was caused by S450L mutation — following the *M. tuberculosis* H37R nomenclature (or S531L according to the *Escherichia coli* nomenclature used by Hain Lifescience). One strain demonstrated H445Y mutation — according to *M. tuberculosis* H37Rv (H526), one was with H445D (H526D), and one with N432L (N513L) mutations in the *rpoB* gene.

S315T mutation responsible for isoniazid resistance was observed in the *katG* gene in strain N:22_09.

³ URL: <https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>

End of Table.

NRL CODE	BACTEC										Test «Geno Type»										«Mykrobe»									
	Streptomycin	Isoniazid	Rifampicin	Ethambutol	Ofloxacin	Amikacin	Kanamycin	Kapreomycin	Pyrazinamide (rpb mut)	Isoniazid (katg mut)	Isoniazid (inba mut)	Fluoroquinolones (gyramut)	Kanamycin/amikacin (rsmut)	Ethambutol (embmut)	Rifampicin	Isoniazid	Ethambutol	Streptomycin	Pyrazinamide	Ciprofloxacin	Fluoroquinolones	Ofloxacin	Moxifloxacin	Ciprofloxacin	Amikacin	Kanamycin				
23_10	NA	R	R	NA	R	S	S	S	S450L(S531L)	0	C-15T	NA	NA	NA	S450L(S531L)	C-15T	M306V	C517X	S	S	A90V	A90V	A90V	A90V	S	S				
24_10	R	R	R	R	R	S	S	S	S450L(S531L)	0	C-15T	A90V	0	M306V	S450L(S531L)	C-15T	M306V	C517X	S	S	A90V	A90V	A90V	A90V	S	S				
34_09	R	R	R	R	R	S	S	S	NA	NA	NA	NA	NA	S450L(S531L)	C-15T	M306V	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S				
37_09	R	R	R	R	R	S	S	S	NA	NA	NA	NA	NA	S450L(S531L)	C-15T	M306V	C517X	G97C	S	S	S	S	S	S	S	S				
38_10	NA	R	R	NA	R	S	S	S	S450L(S531L)	0	C-15T	NA	NA	S450L(S531L)	C-15T	M306V	C517X	V139A	S	S	D94H	D94H	D94H	D94H	S	S				
39_10	R	R	R	R	R	S	S	S	S450L(S531L)	0	C-15T	NA	NA	S450L(S531L)	C-15T	M306V	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S				
41_10	R	R	R	R	R	S	S	S	S450L(S531L)	0	C-15T	0	0	M306V	S450L(S531L)	C-15T	M306V	A514X	S	S	S	S	S	S	S	S				
45_10	R	R	R	R	R	S	S	S	S450L(S531L)	0	C-15T	NA	NA	S450L(S531L)	C-15T	M306V	A514X	S	S	S	S	S	S	S	S	S				
49_10	NA	R	R	NA	R	S	S	S	S450L(S531L)	0	C-15T	NA	NA	S450L(S531L)	C-15T	M306V	A514X	S	S	S	S	S	S	S	S	S				
52_10	R	R	R	R	R	S	S	S	S450L(S531L)	0	C-15T	NA	NA	S450L(S531L)	C-15T	M306V	C517X	G97C	S	S	A90V	A90V	A90V	A90V	S	S				
60_10	R	R	R	R	R	R	R	R	S450L(S531L)	0	C-15T	D94G	A1401G	M306V	S450L(S531L)	I194T	M306V	S	H82R	S	A90V	D94H	D94H	D94H	A-1400G	A-1400G				
62_10	R	R	R	R	R	NA	NA	NA	NA	NA	NA	D94G	A1401G	M306V	S450L(S531L)	C-15T	M306V	S	S	A90V	D94H	D94H	D94H	A-1400G	A-1400G					
72_10	R	R	R	R	R	S	S	S	NA	NA	NA	NA	NA	S450L(S531L)	C-15T	M306V	A514X	P69L	S	S	S	S	S	S	S	S				
32_11	R	R	R	R	R	S	S	S	S450L(S531L)	0	C-15T	D94A	0	M306V	S450L(S531L)	C-15T	M306V	A514X	G97C	S	A90V	D94A	D94A	D94A	S	S				
78_11	R	R	R	R	R	S	S	S	S450L(S531L)	0	C-15T	0	0	M306V	S450L(S531L)	C-15T	M306V	A514X	S	S	S	S	S	S	S	S				
BCG	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0	0	0	0	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S				
SL222																														
Sofia																														

Note. Results with BACTEC system-drug susceptible (S) and drug resistant (R). Geno Type detected mutations in *rpoB* gene conferring resistance to rifampicin are reported according to nomenclature in *M. tuberculosis* H37Rv. In brackets is the same mutation according to nomenclature in *E. coli*. Resistance conferring mutation to isoniazid is in the promoter region of *inhA* gene, a nucleotide substitution C-15T. Mutation in *rrs* gene leading to amikacin and kanamycin resistance is a nucleotide substitution A-1400G in rRNA gene. NA — no data. 0 — mutation not detected.

In strain, N:60_10 double mutation in the *inhA* gene was detected. I194T mutation in the *inhA* gene was proven in combination with C-15T mutation in the promoter region of the *inhA* gene. C-15T mutation in the promoter region of the *inhA* gene was found in 33 strains, which is responsible for isoniazid resistance. C-15T mutation is prevalent and most widespread (> 50%) among the MDR strains of *M. tuberculosis* isolated in Bulgaria with spoligotype SIT41 (TUR) [30]. These results were consistent with previous studies [30–33]. We can conclude that the C-15T mutation itself is a marker for isoniazid resistance in investigated strains with SIT41 spoligotype and is predictive for MDR.

We observed a 75% (21/28) overlapping rate between BACTEC and Mykrobe for ethambutol resistance. In 4 strains (13%), M306V mutation in the *embB* gene was proven, which was expected to cause ethambutol resistance, but these strains were phenotypically susceptible. We can suggest that in these four strains M306V mutation is a polymorphism unrelated to phenotypic ethambutol resistance. Strain 22_09 was phenotypically identified as resistant, but mutation M306V or another related was not identified. This strain might have other, unknown mutations leading to ethambutol resistance

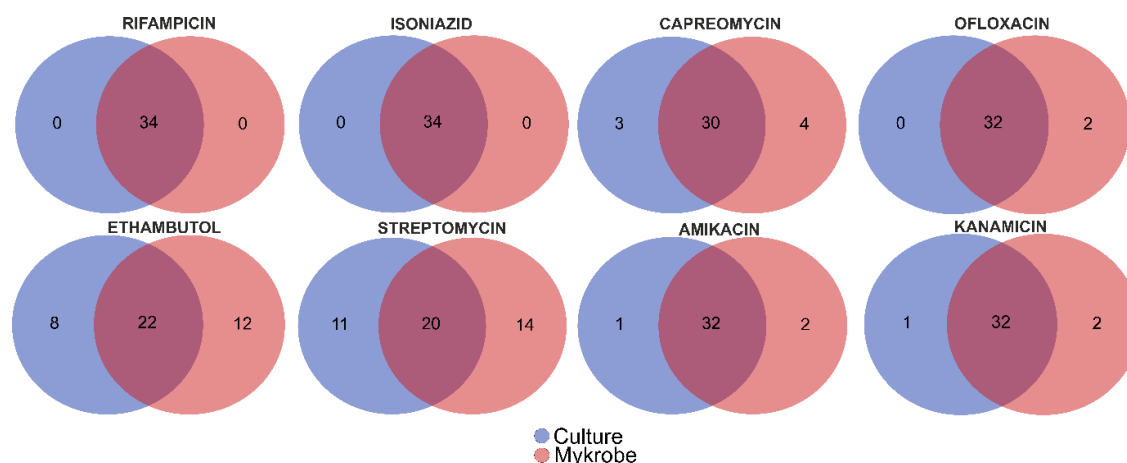
The sensitivity of some strains to streptomycin was very interesting. Phenotypically 87% ($n = 27$) of streptomycin-resistant strains were proven and only 59% ($n = 19$) were detected by Mykrobe. In 8 strains streptomycin sensitivity was detected by analysis of FASTQ files with Mykrobe, while BACTEC showed phenotypic resistance to this antituberculosis drug. For 19 strains proven by Mykrobe streptomycin resistance, we identified in 2 of them that streptomycin resistance was caused by A450X nucleotide mutation, in 9 by A514X, and in 8 by C517X nucleotide mutation in *rrs* gene encoding 16S rRNA which is responsible

for streptomycin resistance. We can suggest that other unknown mutations, different from the described above in *rpsL*, *rrs*, and *gidB* genes, are responsible for streptomycin resistance. In other cases, streptomycin resistance can be caused by efflux or change in streptomycin targeting. Our investigation showed that the Mykrobe software tool has limited capability to test streptomycin resistance, giving a 30% error rate.

Different mechanisms of fluoroquinolone resistance were found in different strains [34]. In strains 21_10, 23_10, 24_10, 52_10, 60_10, and 62_10, resistance to ofloxacin, moxifloxacin and ciprofloxacin was caused by A90V mutation in *gyrA* gene and in strains 38_10, 60_10, 32_11 and 62_10, by D94H mutation in the same gene. Comparing phenotypic and genotypic resistance to ofloxacin, amikacin and kanamycin, we observed 100% coincidence of results. Six strains were phenotypically and genotypically proven as pre-XDR with 100% coincidence to fluoroquinolone resistance. A disadvantage of our study is the small number of proven MDR strains resistant to this drug. In the studied group of MDR strains, we observed two that were phenotypically and genotypically confirmed as XDR.

The susceptibility of the strains to pyrazinamide was evaluated only with Mykrobe. Seventeen (50%) pyrazinamide resistance strains were observed. Resistance was caused by six different mutations in the *pncA* gene. The most often detected mutation was P69L in 6 strains. G97C was the second most common mutation proven in 4 strains. Based on these results, we can conclude that resistance to pyrazinamide is a result of several mutations in the *pncA* gene.

All studied by us *M. tuberculosis* strains with Geno Type test and Mykrobe tool showed identical results for antituberculosis drug resistance. Mykrobe gave more full and detailed information (Figure). The disadvantage of Geno Type is that it does not cover all mu-



Venn diagram representing the agreement between resistant phenotypes identified by phenotypic cultural method and Mykrobe software prediction tool for 8 tuberculostatics.

Recently, new software tools were developed for the analysis of resistance of different species of microorganisms, which will be applied in our future studies [24, 35].

tations responsible for the resistance of *M. tuberculosis* to the currently applied anti-TB drugs.

Conclusion

Currently, different methods of identifying drug resistance have been developed and introduced into practice. Next-generation sequencing and bioinformatics data analysis are fast developing technologies and they will be used more widely soon. Next-generation sequencing technologies will be mandatory in the characterization and registration of new strains. Comparison of different methods showed that in some cases one could identify a mismatch between expected and observed phenotypes and genotypes. The genotypes include marker genes or other genome regions involved in drug resistance. Resistance can be caused by other unknown markers. This fact does not allow us to ignore phenotypic methods for the determination of antimicrobial resistance, and to prescribe drugs based on DNA analyses, despite enormous possibilities provided by whole-genome sequencing and bioinformatics. However, phenotypic methods do not determine the mechanism of resistance. Application of whole genome sequencing assay allows observing different genetic modifications associated with different mechanisms causing drug-resistance of *M. tuberculosis* complex. Different mutations cause different levels of resistance, and this will be the subject of our future investigations. Next-generation sequencing allows not only to compare data with phenotypically detected resistance but also to find relations between a mutation(s) and level of resistance.

REFERENCES

- WHO. European Centre for Disease Prevention and Control, WHO Regional Office for Europe. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2021 – 2019 data. Copenhagen; 2021. Available at: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/tuberculosis-surveillance-and-monitoring-europe-2021-2019-data>
- Jagielski T. Partnership to Fight Against TB in Central and Eastern Europe (FATE). FATE: the new partnership to Fight Against TB in Central and Eastern Europe. *Lancet Infect. Dis.* 2017; 17(4): 363. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30120-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30120-2)
- Milanov V., Falzon D., Zamfirova M., Varleva T., Bachiyska E., Koleva A., et al. Factors associated with treatment success and death in cases with multidrug-resistant tuberculosis in Bulgaria, 2009–2010. *Int. J. Mycobacteriol.* 2015; 4(2): 131–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2015.03.005>
- Yordanova S., Baykova A., Atanasova Y., Todorova Y., Bachiyska E. Isoniazid-monoresistant tuberculosis in Bulgaria. *Probl. Inf. Parasit. Dis.* 2020; 48(1): 21–4. Available at: <https://pipd.ncipd.org/index.php/pipd/article/view/29>
- Singh A., Prasad R., Balasubramanian V., Gupta N. Drug-resistant tuberculosis and HIV infection: current perspectives. *HIV AIDS (Auckl.)*. 2020; 12: 9–31. <https://doi.org/10.2147/HIV.S193059>
- van der Werf M.J., Ködmön C., Zucs P., Hollo V., Amato-Gauci A.J., Pharris A. Tuberculosis and HIV coinfection in Europe: looking at one reality from two angles. *AIDS*. 2016; 30(18): 2845–53. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001252>
- Yancheva-Petrova N.A., Milanov V., Strashimirov D., Kostadinov D. Case of an HIV-positive patient co-infected with multidrug-resistant tuberculosis. *Probl. Inf. Parasit. Dis.* 2019; 47(1): 21. Available at: https://pipd.ncipd.org/index.php/pipd/article/view/47_1_4_CASE_OF_AN_HIV_POSITIVE_PA-TIENT_CO-INFECTED_WITH_MULTIDR
- Miotto P., Tessema B., Tagliani E., Chindelevitch L., Starks A.M., Emerson C., et al. A standardized method for interpreting the association between mutations and phenotypic drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur. Respir. J.* 2017; 50(6): 1701354. <https://doi.org/10.1183/13993003.01354-2017>
- Satta G., Atzeni A., McHugh T.D. *Mycobacterium tuberculosis* and whole genome sequencing: a practical guide and online tools available for the clinical microbiologist. *Clin. Microbiol. Infect.* 2017; 23(2): 69–72. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.09.005>
- Papaventsis D., Casali N., Kontsevaya I., Drobniowski F., Cirillo D.M., Nikolayevskyy V. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* for detection of drug resistance: a systematic review. *Clin. Microbiol. Infect.* 2017; 23(2): 61–8. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.09.008>
- Tagliani E., Anthony R., Kohl T.A., de Neeling A., Nikolayevskyy V., Ködmön C., et al. Use of a whole genome sequencing-based approach for *Mycobacterium tuberculosis* surveillance in Europe in 2017–2019: An ECDC pilot study. *Eur. Respir. J.* 2020; 57(1): 2002272. <https://doi.org/10.1183/13993003.02272-2020>
- Hunt M., Mather A.E., Sánchez-Busó L., Page A.J., Parkhill J., Keane J.A., et al. ARIBA: rapid antimicrobial resistance genotyping directly from sequencing reads. *Microb. Genom.* 2017; 3(10): e000131. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000131>
- Yang Y., Jiang X., Chai B., Ma L., Li B., Zhang A., et al. ARGs-OAP: online analysis pipeline for antibiotic resistance genes detection from metagenomic data using an integrated structured ARG-database. *Bioinformatics*. 2016; 32(15): 2346–51. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw136>
- Gupta S.K., Padmanabhan B.R., Diene S.M., Lopez-Rojas R., Kempf M., Landraud L., et al. ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014; 58(1): 212–20. <https://doi.org/10.1128/AAC.01310-13>
- Iwai H., Kato-Miyazawa M., Kirikae T., Miyoshi-Akiyama T. CASTB (the comprehensive analysis server for the *Mycobacterium tuberculosis* complex): A publicly accessible web server for epidemiological analyses, drug-resistance prediction and phylogenetic comparison of clinical isolates. *Tuberculosis (Edinb.)*. 2015; 95(6): 843–4. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.09.002>
- Steiner A., Stucki D., Coscolla M., Borrell S., Gagneux S. KvarQ: targeted and direct variant calling from fastq reads of bacterial genomes. *BMC Genomics*. 2014; 15(1): 881. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-881>
- Kohl T.A., Utpatel C., Schleusener V., De Filippo M.R., Beckert P., Cirillo D.M., et al. MTBseq: a comprehensive pipeline for whole genome sequence analysis of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *PeerJ*. 2018; 6: e5895. <https://doi.org/10.7717/peerj.5895>
- Feuerriegel S., Schleusener V., Beckert P., Kohl T.A., Miotto P., Cirillo D.M., et al. PhyResSE: a web tool delineating *Mycobacterium tuberculosis* antibiotic resistance and lineage from whole-genome sequencing data. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53(6): 1908–14. <https://doi.org/10.1128/JCM.00025-15>
- Davis J.J., Boisvert S., Brettin T., Kenyon R.W., Mao C., Olson R., et al. Antimicrobial resistance prediction in PATRIC and RAST. *Sci. Rep.* 2016; 6(1): 27930. <https://doi.org/10.1038/srep27930>
- Zankari E., Hasman H., Cosentino S., Vestergaard M., Rasmussen S., Lund O., et al. Identification of acquired antimicrobi-

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- al resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 2012; 67(11): 2640–4.
<https://doi.org/10.1093/jac/dks261>
21. McArthur A.G., Waglechner N., Nizam F., Yan A., Azad M.A., Baylay A.J., et al. The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013; 57(7): 3348–57.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00419-13>
22. Inouye M., Dashnow H., Raven L.A., Schultz M.B., Pope B.J., Tomita T., et al. SRST2: Rapid genomic surveillance for public health and hospital microbiology labs. *Genome Med.* 2014; 6(11): 90. <https://doi.org/10.1186/s13073-014-0090-6>
23. de Man T.J., Limbago B.M. SSTAR, a stand-alone easy-to-use antimicrobial resistance gene predictor. *mSphere.* 2016; 1(1): e00050-15. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00050-15>
24. Phelan J.E., Lim D.R., Mitarai S., de Sessions P.F., Tujan M.A.A., Reyes L.T., et al. *Mycobacterium tuberculosis* whole genome sequencing provides insights into the Manila strain and drug-resistance mutations in the Philippines. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 9305.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-45566-5>
25. Coll F., McNERNEY R., Preston M.D., Guerra-Assunção J.A., Warry A., Hill-Cawthorne G., et al. Rapid determination of anti-tuberculosis drug resistance from whole-genome sequences. *Genome Med.* 2015; 7(1): 51.
<https://doi.org/10.1186/s13073-015-0164-0>
26. Hunt M., Bradley P., Lapierre S.G., Heys S., Thomsit M., Hall M.B., et al. Antibiotic resistance prediction for *Mycobacterium tuberculosis* from genome sequence data with Mykrobe. *Wellcome Open Res.* 2019; 4: 191.
<https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.15603.1>
27. van Soolingen D., de Haas P.E., Hermans P.W., van Embden J.D. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Enzymol.* 1994; 235: 196–205.
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)35141-4](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)35141-4)
28. Bradley P., Gordon N., Walker T., Dunn L., Heys S., Huang B., et al. Rapid antibiotic-resistance predictions from genome sequence data for *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Commun.* 2015; 6: 10063.
<https://doi.org/10.1038/ncomms10063>
29. Panaiotov S., Hodzhev Y., Tolchkov V., Tsafarova B., Mihailov A., Stefanova T. Complete genome sequence, genome stability and phylogeny of the vaccine strain *Mycobacterium bovis* BCG SL222 Sofia. *Vaccines (Basel).* 2021; 9(3): 237.
<https://doi.org/10.3390/vaccines9030237>
30. Bachiyiska E., Yordanova S., Atanasova Y. Phenotypic and genetic characterization of tuberculosis strains in Bulgaria in 2011. *InSpiro.* 2013; (1): 38–41. (in Bulgarian)
31. Panaiotov S., Bachiyiska E., Yordanova S. Genetic biodiversity of sensitive and multi-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Bulgaria. *Med. Rev.* 2016; 52(3): 47–54. (in Bulgarian)
32. Yordanova S., Bachiyiska E., Atanasova Y. Multidrug resistant tuberculosis in Bulgaria — microbiological aspects. *Probl. Inf. Parasit. Dis.* 2013; 41: 5–8.
33. Bachiyiska E., Yordanova S., Atanasova Y. Multi drug resistant tuberculosis in Bulgaria — gene mutations associated. *InSpiro.* 2016; 37: 36–40. (in Bulgarian)
34. Yordanova S., Bachiyiska E., Atanasova Y. MDR-TB with additional fluoroquinolone resistance in Bulgaria. *Probl. Inf. Parasit. Dis.* 2015; 43(2): 8–11.
35. Kohl T.A., Utpatel C., Schleusener V., De Filippo M.R., Beckert P., Cirillo D.M., et al. MTBseq: a comprehensive pipeline for whole genome sequence analysis of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *PeerJ.* 2018; 6: e5895.
<https://doi.org/10.7717/peerj.5895>

Information about the authors

Vladimir Tolchkov — PhD, assistant professor, National Reference Laboratory (NRL) for high risk bacterial infections, Department of Microbiology, National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria, tolchkov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8005-6036>

Yordan Hodzhev — PhD student, NRL for high-risk bacterial infections, Department of Microbiology, National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria, <https://orcid.org/0000-0002-7770-3316>

Borislava Tsafarova — PhD student, NRL for high-risk bacterial infections, Department of Microbiology, National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria, <https://orcid.org/0000-0002-8183-3869>

Elizabeta Bachiyiska — PhD, Associate Professor, Head, NRL for tuberculosis, Department of Microbiology, National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria, <https://orcid.org/0000-0003-2949-5011>

Yuliana Atanasova — PhD student, biologist, NRL for tuberculosis, Department of Microbiology, National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria, <https://orcid.org/0000-0001-6255-375X>

Ana Baykova — biologist, NRL for tuberculosis, Department of Microbiology, National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria, <https://orcid.org/0000-0002-4596-0270>

Stanislava Yordanova — PhD, Assistant Professor, NRL for tuberculosis, Department of Microbiology, National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria, <https://orcid.org/0000-0003-4856-3665>

Alberto Trovato — PhD, senior researcher, WHO Collaborating Centre and TB Supranational Reference Laboratory San Raffaele Scientific Institute, Milano, Italy, <https://orcid.org/0000-0003-4494-5762>

Daniela Cirillo — PhD, Head, WHO Collaborating Centre and TB Supranational Reference Laboratory San Raffaele Scientific Institute, Milano, Italy, <https://orcid.org/0000-0001-6415-1535>

Stefan Panaiotov — DSc, professor, NRL for high-risk bacterial infections, Department of Microbiology, National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria, <https://orcid.org/0000-0001-9997-5198>

Authors' contribution. VT — data analysis, manuscript writing; YH — data analysis of observed results, article editing; BT — analysis of results; EB — sample collection, article editing, microbiological and molecular biological investigations; YA — microbiological and molecular genetic investigations, data collection; AB — microbiological and molecular genetic investigations and data collection; SY — microbiological and molecular genetic investigations and data collection; AT — genome sequencing, analysis of results, graphical presentation of results; DC — study design and coordination, development of the concept, funding of the investigations; SP — study design and coordination, development of the concept, funding of the investigations, manuscript writing. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, material collection, analysis, data interpretation, drafting and revising the manuscript and final approval of the version to be published.

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-194>

Иммуногенность препарата «Живая вакцина интраназального применения для профилактики коклюша» (ГамЖВК) при однократном применении у здоровых добровольцев

Медкова А.Ю.¹, Лиджиева А.А.¹, Сёмин Е.Г.¹, Синяшина Л.Н.¹, Сюндюкова Р.А.¹, Снегирёва Н.А.^{1,2}, Чернышова И.Н.^{1,2}, Гаврилова М.В.^{1,2}, Бушкова К.К.², Колобухина Л.В.¹, Кружкова И.С.¹, Меркулова Л.Н.¹, Русанова М.Г.³, Дьяков И.Н.^{1,2}✉, Каратаев Г.И.¹

¹Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия;

²Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

³Инфекционная клиническая больница № 1 ДЗМ, Москва, Россия

Аннотация

Введение. Значительный рост заболеваемости коклюшем в мире, в том числе среди подростков и взрослых, распространение стёртых форм заболевания, бессимптомное носительство бактерий *Bordetella pertussis* и обусловленная этим потребность в массовой ревакцинации разных возрастных групп населения обосновывают необходимость разработки новых противокклюшных вакцин. В НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи разработана живая коклюшная вакцина интраназального применения для профилактики коклюша (ГамЖВК). Вакцина ГамЖВК прошла доклинические исследования, доказавшие её безопасность и эффективность в экспериментах на мелких лабораторных животных и нечеловекообразных обезьянах. Показана её безопасность в клинических исследованиях на здоровых добровольцах.

Цель исследования — оценка иммуногенности разных доз препарата ГамЖВК при первом применении у здоровых добровольцев.

Материалы и методы. Исследование проводилось как рандомизированное плацебо-контролируемое, слепое, с последовательным включением добровольцев и эскалацией дозы. Идентификатор исследования в базе clinicaltrials.gov: NCT03137927 (A Phase I Clinical Study of a GamLPV, a Live Intranasal *Bordetella Pertussis* Vaccine). Определены параметры гуморального и клеточного иммунного ответа в динамике: уровни специфических IgM-, IgG- и IgA-антител в сыворотке крови добровольцев и количество цитокинов интерлейкина-17, фактора некроза опухоли- α , интерферона- γ , продуцируемых после специфической индукции *in vitro* мононуклеарами периферической крови вакцинированных добровольцев. Оценена динамика персистенции аттенуированных бактерий в носоглотке вакцинированных добровольцев.

Результаты. Интраназальная вакцинация добровольцев препаратом ГамЖВК приводит к формированию специфического гуморального (IgG и IgA) и клеточного иммунного ответа. Показан дозозависимый характер продукции иммуноглобулинов и цитокинов. Аттенуированные бактерии длительно персистируют в носо/ротоглотке вакцинированных добровольцев.

Обсуждение. Хорошая переносимость всех тестируемых доз препарата обосновывает выбор для дальнейшего исследования дозы вакцины, равной 4×10^9 КОЕ. На следующем этапе будут изучены безопасность и иммуногенность двукратной вакцинации добровольцев.

Ключевые слова: живая аттенуированная вакцина, коклюш, *Bordetella pertussis*, интраназальная вакцинация, гуморальный ответ, клеточный ответ, мукозальный ответ, иммуногенность

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов на основании разрешения Министерства здравоохранения РФ от 28.12.2016 № 895.

Благодарность. Работа выполнена с использованием оборудования центра коллективного пользования НИИВС им. И.И. Мечникова.

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: Медкова А.Ю., Лиджиева А.А., Сёмин Е.Г., Синяшина Л.Н., Сюндюкова Р.А., Снегирёва Н.А., Чернышова И.Н., Гаврилова М.В., Бушкова К.К., Колобухина Л.В., Кружкова И.С., Меркулова Л.Н., Русанова М.Г., Дьяков И.Н., Каратаев Г.И. Иммуногенность препарата «Живая вакцина интраназального применения для профилактики коклюша» (ГамЖВК) при однократном применении у здоровых добровольцев. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(6):706–720.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-194>

Immunogenicity of the drug "Live intranasal vaccine for the prevention of pertussis" (GamLPV) with a single use in healthy volunteers

Alisa Yu. Medkova¹, Alevtina A. Lidzhiyeva¹, Evgeniy G. Semin¹, Lyudmila N. Sinyashina¹, Rezida A. Syundyukova¹, Nadezhda A. Snegireva^{1,2}, Irina N. Chernyshova^{1,2}, Marina V. Gavrilova^{1,2}, Kristina K. Bushkova², Lyudmila V. Kolobukhina¹, Irina S. Kruzhkova¹, Liliya N. Merkulova¹, Marina G. Rusanova³, Ilya N. Dyakov^{1,2}✉, G.I. Karatayev¹

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

²I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccine and Sera, Moscow, Russia;

³Infectious Clinical Hospital No. 1 of the Moscow Department of Health, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. A significant increase in the incidence of pertussis in the world, including among adolescents and adults, the prevalence of mild forms of the disease and asymptomatic carrier of bacteria *B. pertussis*, and the resulting need for mass revaccination of different age groups determine the demand for new vaccines against *B. pertussis*. In N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, a live intranasal pertussis vaccine for the prevention of pertussis (GamLPV) has been developed. The GamLPV vaccine underwent preclinical studies that proved its safety and effectiveness in experiments on small laboratory animals and non-human monkeys. Safety of vaccine is shown in clinical studies on healthy volunteers.

The **aim** of the study is to assess the immunogenicity of different doses of the drug GamLPV when first used in healthy volunteers.

Materials and methods. The study was conducted as randomized placebo-controlled, blind trial with consistent volunteer inclusion and dose escalation. Study ID in clinicaltrials.gov database: NCT03137927 (A Phase I Clinical Study of a GamLPV, a Live Intranasal *Bordetella Pertussis* Vaccine). The following parameters of humoral and cellular immune responses were assessed in dynamics: levels of specific IgM, IgG and IgA antibodies in blood serum of volunteers and the number of cytokines interleukin-17, tumor necrosis factor- α , interferon- γ produced after specific induction *in vitro* of blood mononuclears of vaccinated volunteers. Dynamics of attenuated bacteria persistence in nasopharynx of vaccinated volunteers was evaluated.

Results. Intranasal vaccination of volunteers with the drug Gam LPV resulted in the formation of a specific humoral (IgG and IgA) and cellular immune response. The dose-dependent nature of immunoglobulin and cytokine production was shown. Attenuated bacteria persisted for a long time in the nose/oropharynx of vaccinated volunteers.

Discussion. Good tolerability of all tested doses of the drug justifies the choice for further investigation of a vaccine dose equal to 4×10^9 CFU. At the next stage, the safety and immunogenicity of two-time vaccination of volunteers will be studied.

Keywords: *live attenuated vaccine, pertussis, Bordetella pertussis, intranasal vaccination, humoral response, cellular response, mucosal response, immunogenicity*

Ethics approval. The study was carried out with the voluntary informed consent of patients on the basis of the permission of the Ministry of Health of the Russian Federation dated December 28, 2016 No. 895.

Acknowledgement. The study was carried out using the equipment of the Collective Usage Center of I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccine and Sera.

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: Medkova A.Yu., Lidzhiyeva A.A., Semin E.G., Sinyashina L.N., Syundyukova R.A., Snegireva N.A., Chernyshova I.N., Gavrilova M.V., Bushkova K.K., Kolobukhina L.V., Kruzhkova I.S., Merkulova L.N., Rusanova M.G., Dyakov I.N., Karatayev G.I. Immunogenicity of the drug "Live intranasal vaccine for the prevention of pertussis" (GamLPV) with a single use in healthy volunteers. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(6):706–720.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-194>

Введение

Несмотря на проводимую в разных странах с начала 1950-х гг. массовую противокклюшную вакцинацию, элиминации возбудителя среди населения не происходит. По некоторым расчётам,

в 1990-е — начале 2000-х гг. на фоне гиподиагностики коклюша в мире регистрировалось более 48,5 млн случаев заболевания разной степени тяжести, из которых около 300 тыс. заканчивались летальным исходом [1]. В 2008 г. из 16 млн забо-

левших коклюшем 195 тыс. человек умерли [1]. В последние годы отмечается значительный рост числа лабораторно подтверждённых случаев коклюша среди подростков и взрослых [1–3], распространение стёртых форм заболевания, выявлены бессимптомные носительства бактерий *Bordetella pertussis* [2, 4, 5]. В США с охватом детей прививками, близким к 95%, с начала 2000-х гг. отмечен значительный рост регистрации коклюша, приближающийся к довакциному периоду [6, 7]. Растёт заболеваемость в странах Европы, Австралии, Азии [2, 9]. Отмечен рост числа регистрируемых случаев коклюша в Санкт-Петербурге и Москве на фоне сохранения уровня заболеваемости в России [10, 11].

Для профилактики коклюша в настоящее время в мире используют препараты АКДС-вакцины, содержащей корпускулярный коклюшный компонент (ККВ) или бесклеточный коклюшный компонент (БКВ) в сочетании с инактивированными дифтерийным и столбнячным токсинами. Иногда ККВ или БКВ используют как моновакцины. Несмотря на высокую эффективность АКДС, содержащей ККВ, практика её использования выявила побочные эффекты, для устранения которых был предложен препарат БКВ, состоящий из нескольких очищенных антигенов коклюшного микроба. Считается, что БКВ менее реактогенна, но последние исследования показали, что она не обеспечивает антибактериальный иммунитет [12], что приводит к росту числа стёртых форм заболевания и формированию бактерионосительства.

Другим важным недостатком современных коклюшных вакцин является невысокая длительность сформированного иммунитета. При изучении эффективности противокклюшных вакцин различного типа выявлено, что длительность поствакцинального иммунитета не превышает 5–7 лет. После перенесённого заболевания напряжённый иммунитет сохраняется до 15 лет [13].

Как правило, современные коклюшные вакцины вводятся детям старше 2–3 мес не менее 3 раз. Таким образом, полный цикл вакцинации завершается не раньше чем к 6-месячному возрасту ребёнка, а в Германии и Швеции — к 11–13 мес, что сохраняет высокий риск в первые, самые опасные для заболевания коклюшем месяцы его жизни [9].

Рост заболеваемости коклюшем, в том числе среди старших детей и взрослого населения, привёл к пониманию необходимости ревакцинации подростков и взрослых. Рассматривается необходимость вакцинации матерей и формирования «семейного иммунитета» [2–4, 9, 14]. Для этих целей в настоящее время рекомендована только БКВ, которая, как упомянуто выше, не обеспечивает защиту детей и взрослых от заражения и распространения инфекции и, следовательно, малоэффективна для ревакцинации.

В НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи на базе бактерий *B. pertussis* 475, входящих в состав производимой в России вакцины АКДС, разработана живая коклюшная вакцина интраназального применения для профилактики коклюша (ГамЖВК). Вакцина прошла доклинические исследования, доказавшие её безопасность и эффективность в экспериментах на мелких лабораторных животных и нечеловекообразных обезьянах [15–18]. Аналогичная вакцина французских исследователей прошла I фазу клинических исследований [19–21].

ГамЖВК на первом этапе предназначена для ревакцинации подростков, взрослых и формирования семейного иммунитета. После завершения полного цикла клинических исследований ГамЖВК будет использована для ранней вакцинации младенцев. Целью клинического исследования I фазы была оценка профиля безопасности, переносимости и эффективности разных доз препарата ГамЖВК при первом применении у здоровых добровольцев. Результаты оценки безопасности опубликованы в статье А.Ю. Медковой и соавт. [22].

Целью настоящего исследования является оценка иммуногенности разных доз препарата ГамЖВК при первом применении у здоровых добровольцев. Идентификатор исследования в базе clinicaltrials.gov: NCT03137927¹.

Материалы и методы

Дизайн исследования

Исследование проводилось как рандомизированное плацебо-контролируемое, слепое, с последовательным включением добровольцев и эскалацией дозы и выполнялось на основании разрешения Министрства здравоохранения № 895 от 28.12.2016. Все добровольцы, участвовавшие в исследовании, подписали форму добровольного информированного согласия.

Ниже приведены критерии включения и невключения, значимые для оценки иммуногенности используемой вакцины и бактериальной нагрузки в носоглоточных аспиратах. Полный перечень критериев включения, невключения, а также критериев досрочного исключения добровольцев из исследования представлен в дополнительных материалах на сайте журнала².

Критерии включения:

- мужчины и женщины в возрасте 18–40 лет с верифицированным диагнозом «здоров»;
- отсутствие специфических антител к возбудителю коклюша, подтверждённое отрицательным результатом ИФА на специфические IgM и IgG к антигенам *B. pertussis* (см. ниже);

¹ URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03137927?term=vaccine&cond=pertussis&cntry=RU&draw=2&rank=2>

² URL: <https://microbiol.elpub.ru>

- отсутствие ДНК *B. pertussis* в назофарингеальных мазках, подтверждённое методом ПЦР.

Критерии не включения:

- наличие коклюша в анамнезе;
- перенесённая вакцинация против коклюша в течение последних 10 лет, а также любая вакцинация в течение последнего года;
- любое заболевание, которое, по мнению исследователя, может повлиять на результаты исследования или привести к ухудшению состояния здоровья в ходе исследования;
- зарегистрированные сильные поствакцинальные осложнения в анамнезе;
- курсовой приём лекарственных препаратов с профилактической или лечебной целью в течение 1 мес до скрининга;
- участие в других клинических исследованиях или приём исследуемых препаратов в течение 3 мес до скрининга.

Обследование добровольцев и рандомизация

Здоровые добровольцы прошли процедуры скрининга, включавшие физикальный осмотр, оценку жизненно важных показателей, лабораторные исследования, ЭКГ, пикфлоуметрию, а также исследование на наличие специфических антител к возбудителю коклюша в сыворотке крови и наличие бактерий *B. pertussis* в носоглотке. Соответствие всем критериям включения/невключения было подтверждено до включения добровольцев в исследование.

В исследовании участвовали 36 здоровых добровольцев, рандомизированных в 3 группы по 12 человек, различающиеся вводимой дозой исследуемого препарата. В пределах каждой группы добровольцы были рандомизированы в соотношении 3 : 1 (рандомизационный номер присваивали методом генерации случайных чисел с использованием статистической программы «SPSS Statistics v.19.0») по введению исследуемого препарата или плацебо соответственно. Таким образом, в каждой группе 9 добровольцев получали вакцинный препарат и 3 добровольца — плацебо.

Исследуемый препарат, дозы и способ введения

ГамЖВК на основе аттенуированных бактерий *B. pertussis* 4MKS, представлена в виде лиофилизата для приготовления суспензии для интраназального введения и произведена филиалом «Медгамал» НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи. Серии вакцины, использованные в клиническом исследовании, прошли все необходимые этапы контроля.

Препарат вводили с эскалацией дозы по следующей схеме: $2,5 \times 10^8$ КОЕ (доза 1), 10^9 КОЕ (доза 2) и 4×10^9 (доза 3).

В качестве плацебо применяли стерильный лиофилизат стабилизатора, растворённый в 0,9% NaCl для инъекций.

Количественное определение ДНК *B. pertussis* в заднеглоточных аспиратах методом ПЦР в реальном времени (ПЦР РВ)

ДНК бактерий выделяли из смывов с заднеглоточных зондов (аспиратов). Образцы после центрифугирования обрабатывали раствором гуанидина тиоцианата с последующей сорбцией ДНК на магнитном сорбенте фирмы «Promega» [23, 24]. Для определения количества геном-эквивалентов ДНК *B. pertussis* использована разработанная и валидированная нами тест-система ПЦР РВ [25].

Прочие материалы и методы, использованные при обследовании добровольцев, описаны в дополнительных материалах к статье на сайте журнала³.

Оценка уровня специфических IgM-, IgG- и IgA-антител в сыворотке крови добровольцев

Образцы крови отбирали в вакуумные пробирки с активатором свёртывания крови («Vacuette»). Сыворотку крови отбирали после центрифугирования проб в течение 20 мин при 300g для уплотнения сгустка. Уровень специфических антител к возбудителю коклюша *B. pertussis* определяли с помощью ИФА в соответствии с инструкцией производителя тест-систем «RIDASCREEN® Bordetella IgG» «RIDASCREEN® Bordetella IgM» и «RIDASCREEN® Bordetella IgA» («R-Biopharm»). Доброволец считался положительным при уровне антител IgG > 17 ЕД/мл для IgM > 18 ЕД/мл для IgG (согласно инструкции к применению тест-систем).

Оценка клеточного иммунного ответа на введение вакцины

Клеточный иммунный ответ оценивали по индукции синтеза цитокинов, характерных для Th1- (ИФН- γ) и Th17-клеток (ИЛ-17) в мононуклеарах периферической крови. Определение проводили методом ИФА, выявляя количество цитокинов в надосадочной жидкости при культивировании мононуклеаров из цельной гепаринизированной периферической крови добровольцев с убитыми нагреванием вирулентными *B. pertussis*, до введения препаратов, через 8 ± 2 , 15 ± 2 , 29 ± 2 , 57 ± 2 сут после интраназальной вакцинации добровольцев. Выделенные клетки культивировали *in vitro*.

Получение мононуклеаров периферической крови

Для получения мононуклеаров периферической крови 7,0–7,5 мл цельной крови наслаивали на

³ URL: <https://microbiol.elpub.ru>

среду для сепарации лимфоцитов на основе фикола с плотностью 1,077 г/мл («Cargicorn», «Sigma») и центрифугировали при 1200g в течение 25 мин. Мононуклеары собирали и трёхкратно отмывали DPBS («Пан-ЭКО») от среды для сепарации лимфоцитов, центрифугируя при 400g в течение 10 мин. Полученные клетки взвешивали в полной среде RPMI-1640 («Gibco», «Invitrogen»), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки и все необходимые добавки. Клетки подсчитывали под микроскопом в камере Горяева.

Культивирование клеток in vitro для оценки уровня синтезируемых цитокинов в супернатанте

Мононуклеары периферической крови инкубировали в лунках плоскодонных культуральных 96-луночных планшетов («Thermo») по 10^6 клеток в 200 мкл полной среды RPMI-1640 («Gibco», «Invitrogen»), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки и все необходимые добавки, в течение 24 ч с добавлением вирулентных бактерий *B. pertussis*, инактивированных нагреванием в течение 10 мин при 65°C (индуцированная продукция цитокинов). Спонтанную продукцию интерферона- γ (ИФН- γ), интерлейкина-17 (ИЛ-17) и фактора некроза опухоли- α (ФНО- α) оценивали без дополнительной стимуляции. Для специфической индукции ИФН- γ , ИЛ-17 и ФНО- α в лунки вносили убитые нагреванием вирулентные бактерии *B. pertussis* до конечного соотношения 10^8 бактерий на 10^6 клеток. Клетки инкубировали в течение 24 ч в CO₂-инкубаторе.

Анализ содержания цитокинов в культуральной жидкости

Количество цитокинов ИЛ-17, ФНО- α , ИФН- γ в супернатантах после 24-часового культивирования мононуклеаров периферической крови устанавливали с использованием тест-систем ИФА для определения уровней цитокинов человека («Цитокин») в соответствии с инструкцией производителя. Оптическую плотность измеряли при двойной длине волны 450/630 нм. Уровень цитокинов, индуцируемых специфичным антигеном, рассчитывали как разницу между уровнем цитокинов, продуцируемых *in vitro* спонтанно и при добавлении специфического «активатора».

Чтобы исключить влияние исходного иммунного статуса, из полученных уровней индуцированных цитокинов вычитали значения, выявленные у добровольцев на 0-й день, т.е. до вакцинации или введения плацебо. При этом учитывался только объективный ответ, т.е. возрастание уровня цитокинов. Если уровень индуцируемых цитокинов после вакцинации был ниже, чем на 0-е сутки (разница была отрицательной), считали, что ответ отсутствует

и возрастание равно «0». Также были определены средние значения уровней индуцируемых цитокинов в группе добровольцев, получивших плацебо.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных по иммуногенности ГамЖВК проводили с помощью программного обеспечения «GraphPad Prism v.6.0». Нормальность распределения оценивали с помощью KS-теста. Если распределение значений не соответствовало нормальному, для статистической обработки и оценки достоверности различий между группами использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. При оценке гуморального ответа определяли достоверность различий с нулевой точкой (до вакцинации) среди добровольцев, получивших плацебо, и для каждой дозы вакцины. При оценке клеточного иммунного ответа оценивали достоверность различий кратности возрастания уровня индуцированных цитокинов относительно среднего значения по группе плацебо. Данные представлены в таблицах и на рисунках в виде медианы и межквартильного интервала.

Результаты

В результате первичного скрининга были отобраны 50 серонегативных добровольцев, содержащих специфичные антитела к антигенам *B. pertussis*: IgM-изотипа ≤ 17 ЕД/мл, IgG-изотипа ≤ 18 ЕД/мл. После завершения скрининга до активной фазы исследования с вакцинацией были допущены 36 серонегативных добровольцев, рандомизированных на 3 группы.

Забор крови и ротоглоточных аспиратов осуществляли непосредственно перед введением препаратов, на 8, 15, 29 и 57-е сутки после введения. Ротоглоточные аспираты отбирали также на 1-е сутки после вакцинации.

Гуморальный иммунный ответ

Определение уровня специфических IgM в сыворотке вакцинированных добровольцев не выявило достоверных отличий от исходных их значений в группе плацебо.

Результаты оценки уровня специфических IgG- и IgA-антител в динамике в группе плацебо и среди добровольцев, получивших вакцину, приведены в табл. 1, 2 и на рис. 1, 2. Гистограммы с данными по отдельным пациентам приведены в дополнительных материалах к статье на сайте журнала⁴.

Серопозитивными по IgG считают сыворотки с содержанием антител IgG > 18 ЕД/мл (инструкция «RIDASCREEN®»). При введении дозы 1 из 9 вакцинированных добровольцев на 29-е сутки достигли серопозитивного уровня 5 (56%) человек.

⁴ URL: <https://microbiol.elpub.ru>

Таблица 1. Гуморальный IgG-ответ в группе добровольцев, получивших ГамЖВК
Table 1. Humoral IgG response in the group of vaccinated volunteers

Доза Dose	Показатель Indicator	Уровень антител в различные сроки, сут Antibody level at different times, days				
		0	8	15	29	57
Плацебо Placebo	Медиана (квартили), ЕД/мл Median (Q ₁ ; Q ₃), U/ml	7,00 (4,50; 9,50)	8,50 (4,50; 11,50)	10,00 (5,50; 11,00)	10,00 (7,25; 11,50)	10,00 (7,25; 11,50)
	<i>p</i>	–	0,5949	0,2858	0,2154	0,1384
	Доза 1 Dose 1	Медиана (квартили), ЕД/мл Median (Q ₁ ; Q ₃), U/ml	10,00 (5,50; 10,50)	10,00 (6,50; 17,00)	15,00 (8,75; 26,50)	18,00 (12,00; 30,50)
	<i>p</i>	–	0,3766	0,0323	0,0007	0,0003
Доза 2 Dose 2	Медиана (квартили), ЕД/мл Median (Q ₁ ; Q ₃), U/ml	8,00 (6,00; 10,50)	9,00 (6,50; 14,50)	11,00 (10,00; 20,00)	18,00 (14,50; 24,50)	15,00 (14,00; 34,50)
	<i>p</i> *	–	0,3259	0,0192	<0,0001	<0,0001
	Доза 3 Dose 3	Медиана (квартили), ЕД/мл Median (Q ₁ ; Q ₃), U/ml	8,00 (4,25; 10,00)	8,00 (4,75; 11,50)	15,00 (11,25; 23,00)	17,00 (11,50; 27,50)
	<i>p</i>	–	0,7797	0,0101	0,0031	<0,0001

Примечание. Здесь и в табл. 2: *p* — достоверность различий с 0-ми сутками.

Note. Here and in Table 2: *p* — the reliability of the differences when compared to day 0.

Таблица 2. Гуморальный IgA-ответ в группе добровольцев, получивших ГамЖВК
Table 2. Humoral IgA response in the group of vaccinated volunteers

Доза Dose	Показатель Indicator	Уровень антител в различные сроки, сут Antibody level at different times, days				
		0	8	15	29	57
Плацебо Placebo	Медиана (квартили), ЕД/мл Median (Q ₁ ; Q ₃), U/ml	4,50 (3,00;5,50)	4,50 (2,50;5,25)	4,00 (3,00;4,75)	5,00 (2,00;5,00)	3,00 (1,50;4,00)
	<i>p</i>	–	1,000	0,6218	0,8952	0,1114
	Доза 1 Dose 1	Медиана (квартили), ЕД/мл Median (Q ₁ ; Q ₃), U/ml	5,00 (4,50;7,75)	5,00 (4,50;9,25)	6,5 (4,75;27,00)	11,00 (7,00;50,00)
	<i>p</i>	–	0,8255	0,1159	0,0037	0,0642
Доза 2 Dose 2	Медиана (квартили), ЕД/мл Median (Q ₁ ; Q ₃), U/ml	7,00 (4,00;10,00)	11,00 (4,50;16,00)	17,00 (6,50;26,00)	18,00 (8,00;35,00)	20,00 (9,50;42,50)
	<i>p</i> *	–	0,2968	0,0582	0,0144	0,0093
	Доза 3 Dose 3	Медиана (квартили), ЕД/мл Median (Q ₁ ; Q ₃), U/ml	4,00 (3,50;6,50)	4,50 (4,00;9,00)	12,00 (7,50;31,00)	15,00 (8,00;37,50)
	<i>p</i>	–	0,4688	0,0005	0,0020	0,0006

Ещё 4 добровольца остались серонегативными (< 14 ЕД/мл) и 1 попал в зону неопределённого серологического статуса по IgG (14–18 ЕД/мл). В ответ на вакцинацию дозой 2 исследуемой вакцины на 29-е сутки серопозитивными по IgG-антителам были 5 из 9 вакцинированных (56%). При введении добровольцам максимальной дозы 3 вакцины на 29-е сутки серопозитивными по IgG-антителам были 6 из 9 вакцинированных (67%) и на 59-е сутки — 8 из 9 вакцинированных (89%). Один доброволец на 59-е сутки имел неопределённый серологический статус.

Из приведённых данных видно, что максимального уровня IgG достигает к 29–57-м суткам. Медиана уровня IgG возрастает на дозе 1 в 1,8 раза

на 29-е сутки и в 2 раза — на 57-е, на дозе 2 — в 2,25 и 1,88 раза соответственно, на дозе 3 — в 2,13 и 3,13 раза соответственно.

При оценке уровня специфического IgA серонегативными считаются лица с уровнем IgA < 19 ЕД/мл, неопределённый серологический статус устанавливается при выявлении 19–26 ЕД/мл IgA-антител, а серопозитивным статус признают при уровне IgA-антител в сыворотке крови > 26 ЕД/мл (инструкции для ELISA «RIDASCREEN® Bordetella IgA»).

Как видно из представленных в табл. 2 и на рис. 2 данных, число добровольцев, ответивших на введение вакцины достижением серопозитивного статуса, меньше, чем для IgG. Для дозы 1 — 4 (33%) из 9 вакцинированных, для доз 2 и 3 — только

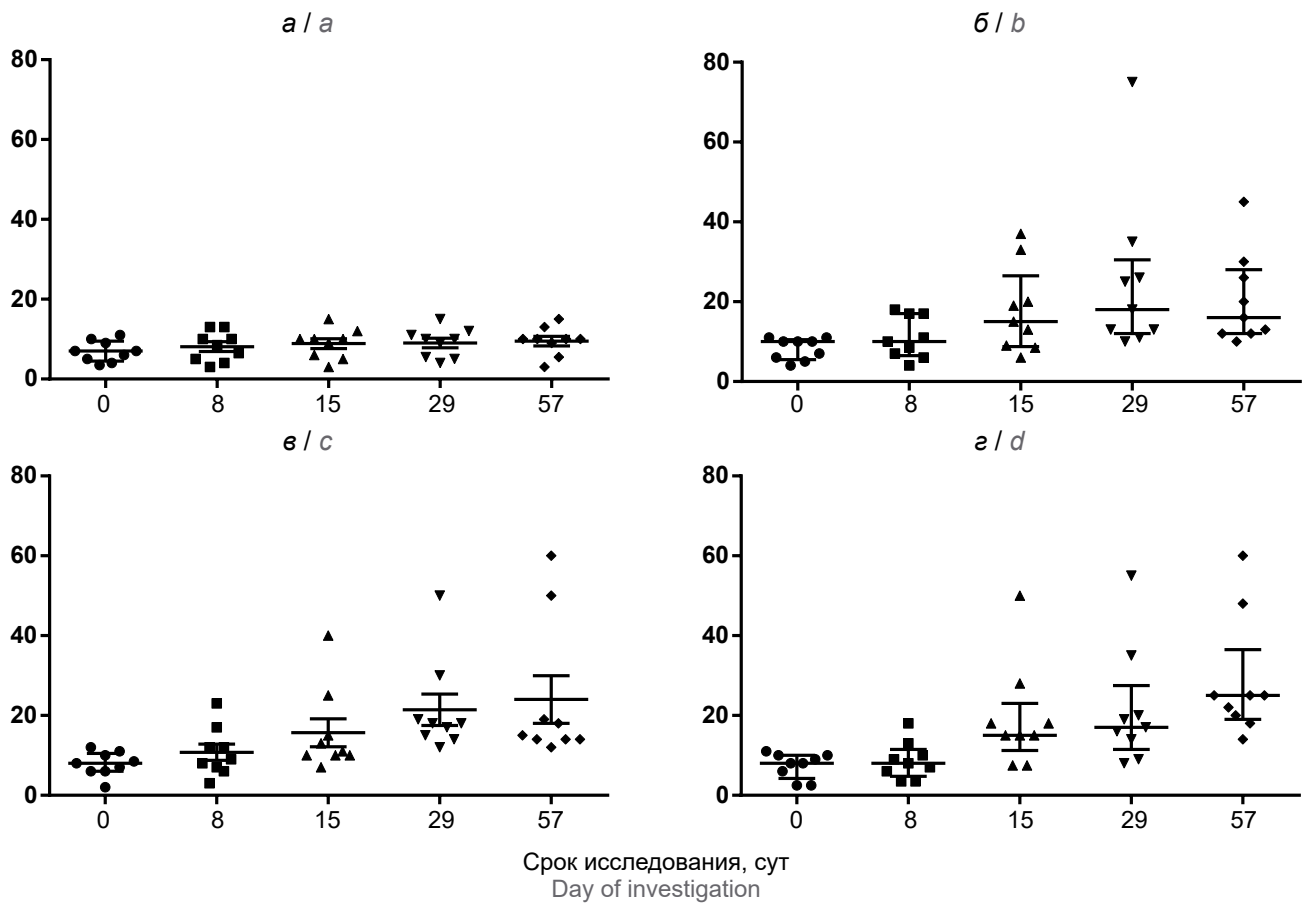


Рис. 1. Уровни IgG (ЕД/мл) в сыворотке крови добровольцев.

а — получившие плацебо; б — получившие ГамЖВК в дозе 1; в — в дозе 2; г — в дозе 3.

Fig. 1. Serum IgG levels (U/ml) of volunteers.

а — placebo group; б — vaccinated with GamLPV at the first dose ($2,5 \times 10^9$);

в — vaccinated with GamLPV at the second dose (10^9); г — vaccinated with GamLPV at maximal dose (4×10^9).

3 (22%) из 9 вакцинированных. В то же время из 7 выявленных случаев IgA-ответа 6 совпали с выявленным IgG-ответом. Наиболее сильный IgA-ответ (100 ЕД/мл и более) выявлен у двух добровольцев, у которых также был отмечен наиболее сильный IgG-ответ (рис. 1, 2). Этот результат может свидетельствовать в пользу корреляции измеренных показателей и требует дальнейшего изучения. Сывороточные IgA-антитела в большинстве случаев (6 из 7) достигали серопозитивного уровня на 15-е сутки (доза 2 — $p = 0,0582$, доза 3 — $p = 0,0005$). Ни у одного из добровольцев, получивших плацебо, специфичные IgA-антитела не были выявлены.

Клеточный иммунный ответ

У добровольцев, однократно интраназально вакцинированных ГамЖВК, была определена продукция индуцированных цитокинов ИФН- γ (Th1), ИЛ-17 (Th17) и ФНО- α в мононуклеарах периферической крови. Поскольку для разных добровольцев наблюдался большой разброс измеренных абсолютных значений, сильно затрудняющий обработку результатов, было принято решение представить

результаты в относительных значениях. Относительное возрастание уровней исследуемых цитокинов рассчитывали как отношение индуцированного уровня цитокина на каждой точке у вакцинированного добровольца к среднему значению в группе плацебо. Результаты измерения содержания цитокинов для каждой дозы вакцины приведены на рис. 3–5.

Интенсивность цитокинового ответа среди вакцинированных добровольцев значительно отличалась. Наибольшие уровни индуцируемого ИФН- γ выявлены в первые 2 нед и на 60-е сутки, что может свидетельствовать об индукции эффекторных Th1-клеток на начальных стадиях иммунного ответа и Th1-клеток памяти в отдаленные сроки после вакцинации. Сопоставление результатов вакцинации добровольцев наименьшей и наибольшей дозами позволяет констатировать наличие дозовой зависимости интенсивности цитокинового ответа — наибольшие уровни индукции цитокинов наблюдались у добровольцев, получивших максимальную дозу вакцины.

Кратность возрастания уровня индуцируемого ИФН- γ в сравнении с исходными значениями в группе плацебо варьировала в диапазоне 0,22–3,87.

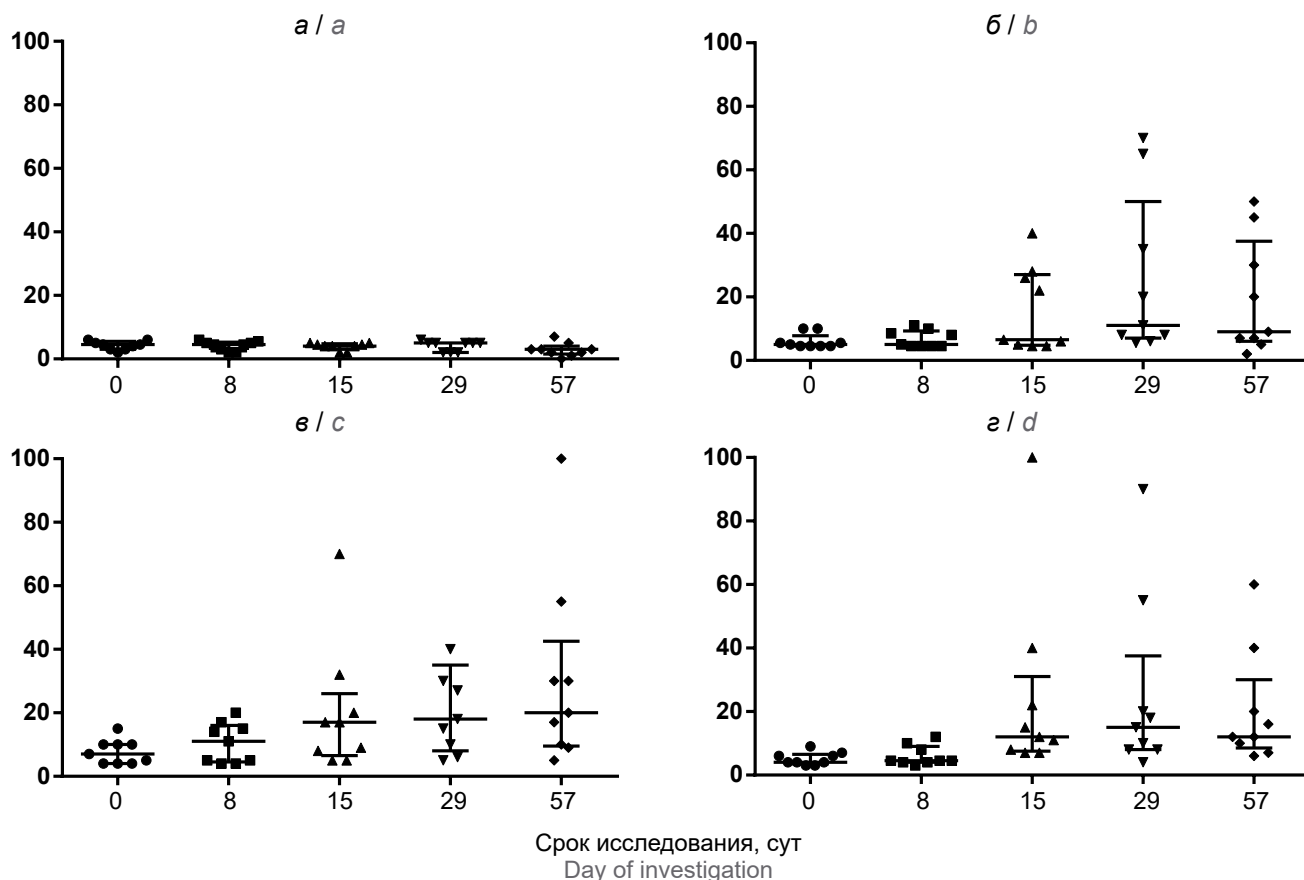


Рис. 2. Уровни IgA в сыворотке крови добровольцев.
 а — получившие плацебо; б — получившие ГамЖВК в дозе 1; в — в дозе 2; г — в дозе 3.

Fig. 2. Serum IgA levels of volunteers.
 a — placebo group; b — vaccinated with GamLPV at the first dose ($2,5 \times 10^8$);
 c — vaccinated with GamLPV at the second dose (10^9); d — vaccinated with GamLPV at maximal dose (4×10^9).

В связи с этим в качестве критерия ответа было принято 4-кратное возрастание уровня индуцируемого ИФН- γ . Среди добровольцев, получивших дозу 1, более чем 4-кратное возрастание выявлено у 4 (44,4%) из 9 добровольцев; при вакцинации дозой 2 — у 1 (11,1%) из 9; при вакцинации дозой 3 — у 5 (55,5%) из 9. Таким образом, наибольший уровень ответа в отношении ИФН- γ был выявлен при применении наиболее высокой (доза 3) дозы вакцинного препарата.

Не понятно практически полное отсутствие превышения уровней индуцируемого ИФН- γ относительно плацебо среди добровольцев, получивших дозу 2. Для этой группы характерен и более слабый специфический антительный ответ на вакцинацию. Причины выявленных отклонений требуют дальнейшего изучения.

При оценке уровней индуцируемого ИЛ-17 наблюдалась более регулярная картина, в том числе у добровольцев, получивших дозу 2 (рис. 4).

Среди добровольцев, получивших плацебо, кратность превышения исходного уровня цитокина варьировала в диапазоне 0,00–4,49, в связи с чем

в качестве критерия ответа было выбрано 5-кратное превышение среднего уровня индуцируемого ИЛ-17 в сравнении с исходными значениями. Среди вакцинированных добровольцев в большинстве случаев наблюдались чёткое возрастание уровней ИЛ-17 и выраженная дозозависимость. Так, среди 9 добровольцев, получивших дозу 1 вакцины, у 4 (44%) было выявлено возрастание уровня индуцируемого ИЛ-17, как минимум 5-кратно превышающее среднее значение для группы плацебо. Среди 9 добровольцев, получивших дозу 2, у 8 (89%) выявлено минимум 5-кратное превышение уровня индуцируемого ИЛ-17 в сравнении с плацебо. При этом только у 1 добровольца наблюдалось 25-кратное возрастание уровня индуцируемого ИЛ-17. При вакцинации дозой 3 ГамЖВК число добровольцев с минимум 5-кратным возрастанием уровня ИЛ-17 несколько снизилось (до 5; 56%), но при этом практически у всех (4 из 5) выявлено минимум 30-кратное возрастание уровня индуцированного ИЛ-17. Таким образом, прослеживается выраженная дозозависимость интенсивности ответа ИЛ-17 на индукцию *B. pertussis*.

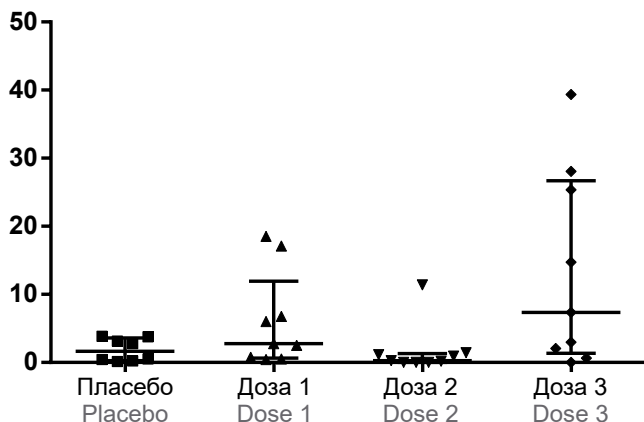


Рис. 3. Максимальные зарегистрированные за период исследования значения кратности возрастания уровня индуцируемого ИФН- γ относительно среднего значения по группе плацебо после 24-часовой индукции *B. pertussis*.

Fig. 3. Maximum multiplicity values of the increase in IFN γ inducible level against placebo group mean after 24-hour induction with *B. pertussis* recorded over the study period.

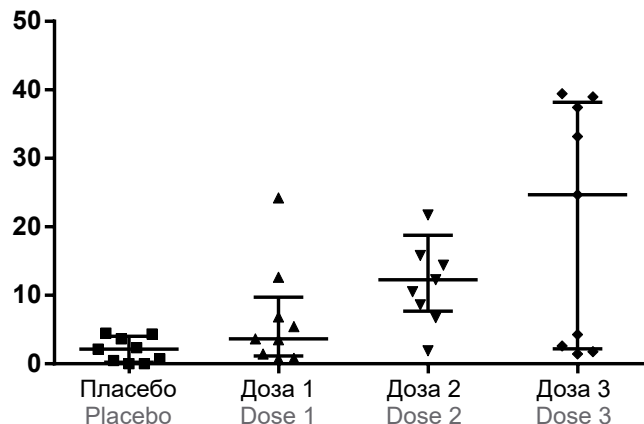


Рис. 4. Максимальные зарегистрированные за период исследования значения кратности возрастания уровня индуцируемого ИЛ-17 относительно среднего значения по группе плацебо после 24-часовой индукции *B. pertussis*.

Fig. 4. Maximum multiplicity values of the increase in IL17 inducible level against placebo group mean after 24-hour induction with *B. pertussis* recorded over the study period.

На рис. 4 приведены максимальные зарегистрированные значения уровня индуцированного ИЛ-17 в сравнении со средними значениями по плацебо. Достоверное увеличение индуцированного ИЛ-17 отмечено при использовании доз 2 и 3 ГамЖВК (в сравнении с плацебо $p = 0,0008$ и $p = 0,0238$ соответственно).

При оценке индуцируемого ФНО- α достоверные различия с исходным уровнем были выявлены только для доз 1 и 3 вакцины ($p = 0,0020$ и $p = 0,0195$ соответственно), что коррелировало с данными, полученными для ИФН- γ (рис. 5).

Разброс кратностей индукции ФНО- α в группе плацебо варьировал в диапазоне 0,00–4,68, в связи с чем в качестве ответа учитывали 5-кратное возрастание уровня индуцируемого ФНО- α . Среди 9 добровольцев, получивших дозу 1, такое возрастание отмечено у 5 (55,5%); среди вакцинированных дозой 2 — у 1 (11,1%); среди вакцинированных дозой 3 — у 2 (22,2%). Выявленное снижение индукции ФНО- α при повышении дозы вакцинного штамма *B. pertussis* требует дальнейшего изучения и проверки на большей популяции добровольцев.

Динамика размножения аттенуированных бактерий *B. pertussis* в носоглотке добровольцев

ДНК *B. pertussis* регистрировали в аспиратах добровольцев через 1 ч, 1, 8, 15, 29 и 57 сут после вакцинации добровольцев. На рис. 6 представлена характерная гистограмма распределения доли добровольцев, в ротоглоточных аспиратах которых достоверно зарегистрирована ДНК аттенуированных бактерий. Динамика элиминации бактерий из ротоглотки для дозы 1 практически не отличается

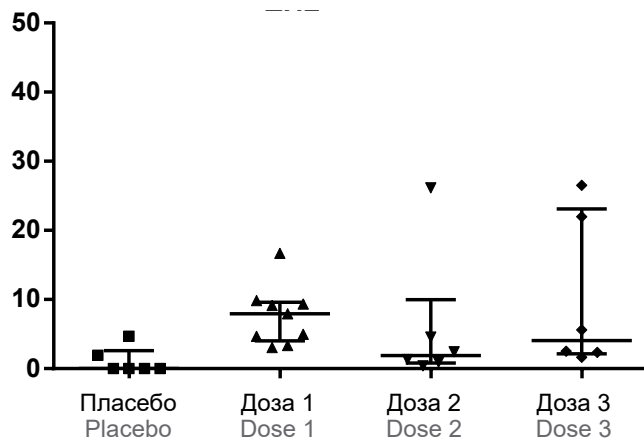


Рис. 5. Максимальные зарегистрированные за период исследования значения кратности возрастания уровня индуцируемого ФНО- α относительно среднего значения по группе плацебо после 24-часовой индукции *B. pertussis*.

Fig. 5. Maximum multiplicity values of the increase in TNF α inducible level against placebo group mean after 24-hour induction with *B. pertussis* recorded over the study period.

от представленной, тогда как при дозе 3 отмечен более резкий спад количества геном-эквивалента (ГЭ) со временем, и к 29-му дню ДНК в ротоглотке не регистрируется.

По причине малого числа добровольцев в каждой когорте и большого разброса измеренных значений числа ГЭ обсуждение динамики их изменения в каждой из групп представляется нецелесообразным.

Обсуждение

Дозозависимость иммунного ответа при вакцинации является характерной, по крайней мере до

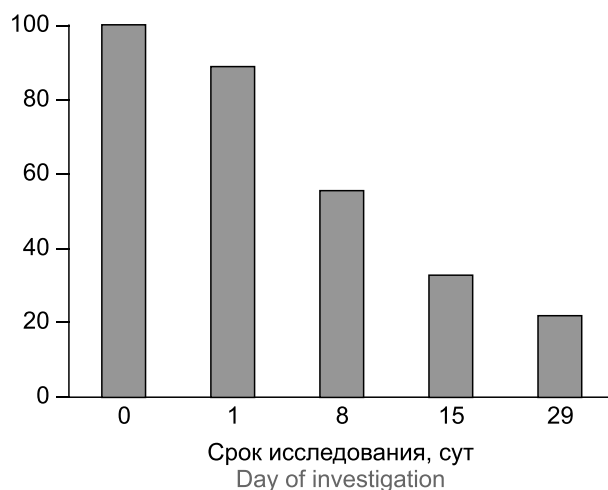


Рис. 6. Доля добровольцев, в ротоглотке которых выявлена ДНК аттенуированных бактерий, после интраназальной вакцинации ГамЖВК в дозе 10^9 КОЕ.

Fig. 6. Percentage of volunteers in whose oropharynx the DNA of attenuated bacteria was detected after intranasal vaccination with GamLPV at a dose of 10^9 CFU.

определённых значений дозы, и положена в основу выбора оптимальной дозы для применения вакцины. Зависимость эффективности живой коклюшной вакцины от дозы показана в экспериментах с иммунизацией взрослых нечеловекообразных обезьян [18, 19] и при вакцинации здоровых добровольцев [21]. В настоящем исследовании лучшие результаты были получены при введении добровольцам максимальной дозы 3 вакцины. На 29-е сутки серопозитивными по IgG-антителам были 6 (67%) из 9 вакцинированных и на 59-е сутки — 8 (89%) из 9 вакцинированных, единственный доброволец на 59-е сутки имел неопределённый серологический статус.

Следует отметить, что достоверное двукратное возрастание количества IgG отмечено у абсолютного большинства добровольцев, получивших вакцину, даже если оно в конечном итоге не достигало диагностически значимых величин. Ни у одного из добровольцев, получивших плацебо, достоверного возрастания IgG не выявлено.

Таким образом, вакцинация добровольцев любой из использованных доз ГамЖВК приводит к более чем двукратному росту IgG, специфических к коклюшному токсину и филаментозному гемагглютину. Полученные результаты позволяют заключить, что однократное введение вакцины ГамЖВК вызывает специфический, дозозависимый IgG-ответ у вакцинированных добровольцев.

Определение IgA-антител в сыворотке крови может быть особенно интересным, учитывая способ введения исследуемой вакцины. IgA является основным изотипом иммуноглобулинов на слизистых. Одна из ключевых его особенностей — неспособность активировать каскад комплемента даже при образовании комплекса со специфичным

антигеном. Это значительно снижает вероятность развития воспаления на слизистой оболочке и, соответственно, её повреждения. Другая важная функция IgA — блокирование на клетке микроорганизма сайтов прикрепления к слизистой, что предотвращает колонизацию слизистой и повышает эффективность элиминации возбудителя. Помимо этого, IgA (в мономерной форме) в относительно больших количествах присутствует в сыворотке крови (второй иммуноглобулин по количеству после IgG). В связи с этим представлялось весьма вероятным появление IgA-антител к *B. pertussis* в сыворотке крови добровольцев после мукозальной (интраназальной) вакцинации. При этом выявление IgA-антител в сыворотке крови может косвенно свидетельствовать о формировании мукозального IgA-иммунного ответа, однако данные о такой корреляции для *B. pertussis* в литературе отсутствуют и это предположение требует проверки.

Как было отмечено выше, из 7 выявленных случаев IgA-ответа 6 совпали с выявленным IgG-ответом. Наиболее сильный IgA-ответ (100 ЕД/мл и более) выявлен у добровольцев, у которых также был отмечен наиболее сильный ответ по IgG (см. дополнительные материалы к статье на сайте журнала⁵). Этот факт может свидетельствовать в пользу корреляции двух ключевых показателей гуморального иммунного ответа и требует дальнейшего изучения.

Другая особенность выявленного IgA-ответа на *B. pertussis* в сыворотке крови — более раннее его начало в сравнении с IgG-ответом. Так, если значимый IgG-ответ развивался не ранее 29-х суток после вакцинации, то IgA-антитела в большинстве случаев (6 из 7) достигали серопозитивного уровня уже на 15-е сутки, а на 59-е сутки наблюдалось снижение их уровня в сравнении с 29-ми сутками. Отчасти это может свидетельствовать о вовлечении в IgA-ответ клеток первой линии защиты: В-1-лимфоцитов, в норме населяющих *lamina propria* респираторного и пищеварительного трактов (а также перитонеальную и плевральную полости) и вносящих значимый вклад в иммунную защиту слизистых оболочек. В-1-клеткам не требуется прохождение длительного этапа дифференцировки для синтеза/секреции IgA, что может объяснить более раннее его появление в сыворотке крови вакцинированных добровольцев. Однако данный вопрос требует дальнейшего изучения.

Как и в случае IgG, возрастание количества IgA отмечено у абсолютного большинства добровольцев, получивших вакцину, даже если у некоторых добровольцев оно в конечном итоге не достигало диагностически значимых величин.

При первичном контакте с патогеном обычно первыми образуются IgM-антитела. В нашем

⁵ URL: <https://microbiol.elpub.ru>

исследовании незначительные изменения уровня IgM-антител в сыворотке крови происходили в серонегативном диапазоне. В отличие от IgA и IgG, изменения содержания IgM-антител по сравнению с исходными значениями недостоверны. Аналогичный результат получен нами при анализе IgM-антител у обезьян, иммунизированных однократно аттенуированными бактериями *B. pertussis* [18]. Отсутствие IgM-антител после вакцинации может быть обусловлено тем, что бактерии аттенуированного штамма *B. pertussis* вызывает инфекционный процесс, при котором не происходит значительного повреждения слизистой оболочки и развития значимого воспалительного процесса, что подтверждается отсутствием клинических проявлений заболевания у вакцинированных добровольцев. Отсутствие проникновения возбудителя через повреждённую слизистую может быть причиной отсутствия значимого системного IgM-ответа. Вместо этого происходит индукция первичного IgA-ответа.

Как видно из представленных данных, у добровольцев, получавших плацебо, уровень антител достоверно не изменялся в течение всего исследования, независимо от их изотипа.

В заключение анализа следует отметить, что в сыворотке крови большинства вакцинированных добровольцев, независимо от дозы, зафиксирован рост содержания IgA и IgG, достигающий серопозитивного уровня, только в 56–89% случаев для IgG и 22–33% случаев для IgA в зависимости от дозы вакцины. Аналогичные результаты получены нами при экспериментальной инфекции и вакцинации обезьян макака резус. После первой экспериментальной инфекции вирулентными или аттенуированными бактериями число животных, в крови которых регистрировался достоверный прирост уровня IgG, составило менее 50% при достоверной регистрации бактерий в носоглотке. При этом повторная иммунизация или инфекция приводили к формированию IgG практически у всех животных [18, 26]. Количество серопозитивных добровольцев после вакцинации коррелирует и с числом серопозитивных людей после перенесённой инфекции, составляющих, по некоторым данным, менее 80% [27].

Низкие абсолютные значения IgA и IgG в ряде случаев могут быть связаны с частичным иммунодефицитом добровольцев. Полученные результаты ещё раз подчёркивают неполное понимание механизмов противокклюшного иммунитета и роли антител в его формировании и обеспечении защиты от инфекции.

Представленные результаты определения гуморального ответа на интраназальную вакцинацию ГамЖВК позволяют утверждать, что однократная вакцинация добровольцев индуцирует выработку специфических сывороточных противокклюшных

антител класса IgA и IgG. Поскольку IgA обеспечивают преимущественно защиту слизистых оболочек, возможно, выявление IgA в секретах рото- и носоглотки может быть более информативным.

Оценивая результаты определения клеточного иммунного ответа, следует отметить, что большой уровень разброса измеренных нами значений индуцированной продукции ИФН- γ и ИЛ-17 отмечался не только у вакцинированных добровольцев, но и в группе плацебо, что значительно затруднило анализ полученных результатов. Тем не менее можно утверждать, что достоверное увеличение продукции ИЛ-17, по крайней мере для двух использованных доз, свидетельствует об индукции Th17-клеточного ответа на интраназальную вакцинацию добровольцев. Этот результат находится в полном соответствии с принятым представлением о роли Th17-ответа в противокклюшном иммунитете [1, 2, 9]. Корреляции между Th17- и Th1-ответом по измеренным параметрам не установлено. Максимальные значения ИФН- γ и ИЛ-17 в большинстве случаев были зарегистрированы у разных добровольцев. Более того, больше всего добровольцев показали более чем 5-кратное превышение уровней ИЛ-17 при введении 2-й дозы вакцины, тогда как возрастание уровня ИФН- γ у этих добровольцев практически не отмечено. Этот результат может предполагать наличие дихотомии ответа на *B. pertussis* по Th1- и Th17-пути. Нужно также отметить, что не было выявлено корреляции между уровнем гуморального иммунного ответа и индукцией исследованных цитокинов.

Полученные результаты позволяют заключить, что интраназальная вакцинация добровольцев препаратом ГамЖВК приводит к формированию специфического гуморального (IgG и IgA) и клеточного иммунного ответа.

Исследования, проведённые нами на этапе доклинического изучения ЖВК, показали, что аттенуированные бактерии *B. pertussis* размножаются в организме обезьян аналогично изогенным вирулентным бактериям [15, 18]. После первой экспериментальной инфекции вирулентные и аттенуированные бактерии регистрируются методом ПЦР РВ в ротоглотке большинства макака резус в течение 2–3 мес. Французские исследователи выявляли в носоглотке павианов анубис аттенуированные бактерии *B. pertussis* BPZE1 с помощью посевов материала назофарингеальных мазков на твёрдую питательную среду вплоть до 5–7 нед [19]. В работе J.M. Warfel и соавт. в носоглотке павианов анубис регистрировали вирулентные бактерии *B. pertussis* D20 в течение 4–5 нед [28]. В исследованиях, проведённых нами совместно с сотрудниками НИИДИ Ленинград, ДНК возбудителя коклюша в носоглотке выздоравливающих больных регистрировали более 3 мес [25].

В наших экспериментах в качестве положительного принимались результаты ПЦР РВ, в которых количество копий ДНК мишени (IS481), определенное по результатам 2 измерений, составляло не менее 10, а сигнал в образцах отрицательного контроля (вода) и контроля выделения отсутствовал или не превышал 1–2 копий. Следует отметить, что чувствительность тест-системы ПЦР РВ была лучше, чем 0,05 ГЭ бактерии *B. pertussis* в 5 мкл [25, 29]. Статистическая достоверность такой чувствительности обусловлена большим числом копий последовательности мишени IS481.

Как видно из рис. 5, ДНК *B. pertussis* регистрируется через час после инфекции в образцах от всех добровольцев, получивших аттенуированные бактерии. Обычно количество ГЭ ДНК *B. pertussis* в 5 мкл образца через час после инфекции находилось в диапазоне 10^3 – 10^5 . Через 1 сут после вакцинации ДНК регистрируется у 5 (56%) из 9 добровольцев, получивших дозу 1, у 8 (89%) из 9 — дозы 2 и 3. Количество ГЭ в ротоглоточном аспирате в 100–1000 раз меньше, чем через 1 ч после инокуляции бактерий. Таким образом, через 1 сут бактерии присутствовали в носоглотке большинства вакцинированных добровольцев, хотя и в значительно меньшем количестве, чем сразу после инокуляции. В носоглотке добровольцев, получивших плацебо, ДНК *B. pertussis* не обнаружена.

Следует заметить, что время персистенции бактерий в организме человека, с нашей точки зрения, является важным фактором защитной активности ГамЖВК. Сопоставление полученных результатов с результатами 2–3-кратной экспериментальной инфекции обезьян вирулентными бактериями и их иммунизации аттенуированными бактериями позволяет предположить, что повторная вакцинация добровольцев будет сопровождаться бустерным эффектом роста титра специфических антител и ускоренной элиминацией возбудителя из носоглотки добровольцев [18–20]. Изучение параметров гуморального и клеточного иммунитета после первой и повторной вакцинации позволит сделать заключение об их роли в обеспечении защитного эффекта ГамЖВК и определит необходимость повторной вакцинации добровольцев для усиления защитной активности вакцины.

Полученные положительные результаты демонстрируют необходимость продолжения клинических исследований препарата ГамЖВК, направленных в том числе на определение схемы и методов вакцинации добровольцев. Сформулирован протокол следующего этапа клинического исследования.

Анализ иммунного ответа на вакцинацию ГамЖВК на следующем этапе исследования необходимо сосредоточить на изучении параметров гуморального ответа и на определении индуцированной продукции растворимых цитокинов в экспериментах

in vitro. Учитывая дозозависимый характер продукции иммуноглобулинов и цитокинов и хорошую переносимость всех тестируемых доз препарата, для дальнейшего исследования предполагается использовать максимальную дозу, равную 4×10^9 КОЕ.

Заключение

Интраназальная однократная вакцинация добровольцев препаратом ГамЖВК приводит к формированию специфического гуморального (IgG и IgA) и клеточного иммунного ответа, характерного для коклюшной инфекции. Зависимость продукции иммуноглобулинов и цитокинов от дозы вакцины, безопасность и хорошая переносимость препарата позволили определить максимальную из исследованных доз (4×10^9 КОЕ) для дальнейших исследований. Аттенуированные бактерии длительно персистируют в носо- и ротоглотке вакцинированных добровольцев. В настоящее время проводятся исследования, направленные на определение схемы и способа введения ГамЖВК здоровым добровольцам. В рамках второго этапа клинического исследования будут изучены безопасность и иммуногенность двукратной вакцинации добровольцев.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Mattoo S., Cherry J.D. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18(2): 326–82. <https://doi.org/10.1128/cmr.18.2.326-382.2005>
2. Kilgore P.E., Salim A.M., Zervos M.J., Schmitt H.J., Wood N., McIntyre P. Pertussis: microbiology, disease, treatment, and prevention. *Clin. Microbiol. Rev.* 2016; 29(3): 449–85. <https://doi.org/10.1128/cmr.00083-15>
3. Wiley K.E., Zuo Y., Macartney K.K., McIntyre P.B. Sources of pertussis infection in young infants: a review of key evidence informing targeting of the cocoon strategy. *Vaccine.* 2013; 31(4): 618–25. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.11.052>
4. Wendelboe A.M., Njamkepo E., Bourillon A., Floret D.D., Gaudelus J., Gerber M., et al. Transmission of *Bordetella pertussis* to young infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2007; 26(4): 293–9. <https://doi.org/10.1097/01.inf.0000258699.64164.6d>
5. Медкова А.Ю., Аляпкина Ю.С., Синяшина Л.Н., Амелина И.П., Алексеев Я.И., Каратаев Г.И. и др. Распространенность стертых форм коклюша и анализ фазовых состояний бактерий *Bordetella pertussis*. *Детские инфекции.* 2010; 9(4): 19–22.
6. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Pertussis epidemic — Washington, 2012. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2012; 61(28): 517–22.
7. Rosewell A., Spokes P.J., Gilmour R.E. NSW Annual vaccine-preventable disease report, 2011. *NSW Public Health Bull.* 2012; 23(9-10): 171–8. <https://doi.org/10.1071/NB12086>
8. Gonfiantini M.V., Carloni E., Gesualdo F., Pandolfi E., Agricola E., Rizzuto E., et al. Epidemiology of pertussis in Italy: disease trends over the last century. *Euro. Surveill.* 2014; 19(40): 20921. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2014.19.40.20921>
9. Salim A.M., Liang Y., Kilgore P.E. Protecting newborns against pertussis: treatment and prevention strategies. *Pediatr. Drugs.* 2015; 17(6): 425–41. <https://doi.org/10.1007/s40272-015-0149-x>

10. Иозефович О.В., Харит С.М., Каплина С.П., Гостев В.В., Сидоренко С.В., Калиногорская О.С. и др. Распространённость коклюша у длительно кашляющих детей 6-17 лет, привитых в раннем возрасте АКДС вакциной. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2012; 66(5): 56–9.
11. Лобзин Ю.В., Харит С.М. Проблемы вакцинопрофилактики: краткая история, современное состояние и пути решения. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2014; (6): 30–7.
12. Warfel J.M., Zimmerman L.I., Merkel T.J. Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014; 111(2): 787–92. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314688110>
13. Guiso N., Njamkepo E., Vié le Sage F., Zepp F., Meyer C.U., Abitbol V., et al. Long-term humoral and cell-mediated immunity after acellular pertussis vaccination compares favourably with whole-cell vaccines 6 years after booster vaccination in the second year of life. *Vaccine*. 2007; 25(8): 1390–7. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.10.048>
14. Kandeil W., van den Ende C., Bunge E.M., Jenkins V.A., Ceregido M.A., Guignard A. A systematic review of the burden of pertussis disease in infants and the effectiveness of maternal immunization against pertussis. *Expert. Rev. Vaccines*. 2020; 19(7): 621–38. <https://doi.org/10.1080/14760584.2020.1791092>
15. Каратаев Г.И., Сияяшина Л.Н., Медкова А.Ю., Семин Е.Г., Шевцова З.В., Матуа А.З. и др. Инсерционная инактивация оперона вирулентности в популяции персистирующих бактерий *Bordetella pertussis*. *Генетика*. 2016; 52(4): 422–30. <https://doi.org/10.7868/S0016675816030085>
16. Сияяшина Л.Н., Семин Е.Г., Медкова А.Ю., Сюндюкова Р.А., Каратаев Г.И. Доклиническое исследование токсичности и безопасности кандидатной живой коклюшной вакцины интраназального применения. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2018; 17(6): 98–108. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-98-108>
17. Сияяшина Л.Н., Семин Е.Г., Медкова А.Ю., Сюндюкова Р.А., Каратаев Г.И. Доклинические исследования защитной активности препарата кандидатной рекомбинантной живой коклюшной вакцины интраназального применения. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019; (3): 60–9. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-3-60-69>
18. Медкова А.Ю., Сияяшина Л.Н., Амичба А.А., Семин Е.Г., Шевцова З.В., Матуа А.З. и др. Доклинические исследования безопасности, иммуногенности и защитной активности аттенуированных бактерий *Bordetella pertussis* на экспериментальной модели *Macaca mulatta*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(4): 312–23. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-3>
19. Loch C., Papin J.F., Lecher S., Debie A.S., Thalen M., Solovay K., et al. Live attenuated pertussis vaccine BPZE1 protects baboons against *Bordetella pertussis* disease and infection. *J. Infect. Dis*. 2017; 216(1): 117–24. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix254>
20. Jahnmatz M., Amu S., Ljungman M., Wehlin L., Chiodi F., Mielcarek N., et al. B-cell responses after intranasal vaccination with the novel attenuated *Bordetella pertussis* vaccine strain BPZE1 in a randomized phase I clinical trial. *Vaccine*. 2014; 32(27): 3350–6. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.04.048>
21. Thorstensson R., Trollfors B., Al-Tawil N., Jahnmatz M., Bergström J., Ljungman M., et al. A phase I clinical study of a live attenuated *Bordetella pertussis* vaccine — BPZE1; a single centre, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating study of BPZE1 given intranasally to healthy adult male volunteers. *PLoS One*. 2014; 9(1): e83449. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083449>
22. Медкова А.Ю., Лиджиева А.А., Семин Е.Г., Сияяшина Л.Н., Сюндюкова Р.А., Дьяков И.Н. и др. Клинические исследования безопасности и переносимости живой вакцины интраназального применения для профилактики коклюша. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021; 10(1): 114–9. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-114-119>
23. Медкова А.Ю., Аляпкина Ю.С., Сияяшина Л.Н., Амелина И.П., Алексеев Г.И., Боковой Я.И. и др. Выявление инсерционных мутантов авирулентных BVG — мутантов *Bordetella pertussis* у больных коклюшем, острой респираторной вирусной инфекцией и практически здоровых людей. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2010; (4): 9–13.
24. Медкова А.Ю., Сияяшина Л.Н., Румянцева Ю.П., Воронина О.Л., Кунда М.С., Каратаев Г.И. Накопление авирулентных инсерционных BVG — мутантов *Bordetella pertussis* при экспериментальной инфекции лабораторных мышей. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2013; 28(4): 22–5.
25. Нестерова Ю.В., Медкова А.Ю., Бабаченко И.В., Семин Е.Г., Калисникова Е.Л., Сияяшина Л.Н. и др. Клинико-диагностическое значение генетических маркеров *Bordetella pertussis* у контактных лиц в семейных очагах. *Журнал инфектологии*. 2019; 11(1): 17–24. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2019-11-1-17-24>
26. Кубрава Д.Т., Медкова А.Ю., Сияяшина Л.Н., Шевцова З.В., Матуа А.З., Конджария И.Г. и др. Экспериментальный коклюш у обезьян. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2013; (8): 4–8.
27. Лобзин Ю.В., Скрипченко Н.В., Волжанин В.М. Новое в диагностике, терапии, реабилитации и профилактике инфекционных заболеваний у детей (по итогам работы детского научно-клинического центра инфекционных болезней в 2016 г). *Журнал инфектологии*. 2017; 9(4): 5–28.
28. Warfel J.M., Beren J., Kelly V.K., Lee G., Merkel T.J. Nonhuman primate model of pertussis. *Infect. Immun*. 2012; 80(4): 1530–6. <https://doi.org/10.1128/iai.06310-11>
29. van der Zee A., Schellekens J.F., Mooi F.R. Laboratory diagnosis of pertussis. *Clin. Microbiol. Rev*. 2015; 28(4): 1005–26. <https://doi.org/10.1128/cmr.00031-15>

REFERENCES

1. Mattoo S., Cherry J.D. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin. Microbiol. Rev*. 2005; 18(2): 326–82. <https://doi.org/10.1128/cmr.18.2.326-382.2005>
2. Kilgore P.E., Salim A.M., Zervos M.J., Schmitt H.J., Wood N., McIntyre P. Pertussis: microbiology, disease, treatment, and prevention. *Clin. Microbiol. Rev*. 2016; 29(3): 449–85. <https://doi.org/10.1128/cmr.00083-15>
3. Wiley K.E., Zuo Y., Macartney K.K., McIntyre P.B. Sources of pertussis infection in young infants: a review of key evidence informing targeting of the cocoon strategy. *Vaccine*. 2013; 31(4): 618–25. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.11.052>
4. Wendelboe A.M., Njamkepo E., Bourillon A., Floret D.D., Gaudelus J., Gerber M., et al. Transmission of *Bordetella pertussis* to young infants. *Pediatr. Infect. Dis. J*. 2007; 26(4): 293–9. <https://doi.org/10.1097/01.inf.0000258699.64164.6d>
5. Medkova A.Yu., Alyapkina Yu.S., Sinyashina L.N., Amelina I.P., Alekseev Ya.I., Karataev G.I., et al. The prevalence of subclinical forms of pertussis and analysis of phase states of bacteria *Bordetella pertussis*. *Detskije infektsii*. 2010; 9(4): 19–22. (in Russian)
6. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Pertussis epidemic — Washington, 2012. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep*. 2012; 61(28): 517–22.
7. Rosewell A., Spokes P.J., Gilmour R.E. NSW Annual vaccine-preventable disease report, 2011. *NSW Public Health Bull.*

- 2012; 23(9-10): 171–8.
<https://doi.org/10.1071/NB12086>
8. Gonfiantini M.V., Carloni E., Gesualdo F., Pandolfi E., Agricola E., Rizzuto E., et al. Epidemiology of pertussis in Italy: disease trends over the last century. *Euro. Surveill.* 2014; 19(40): 20921. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2014.19.40.20921>
 9. Salim A.M., Liang Y., Kilgore P.E. Protecting newborns against pertussis: treatment and prevention strategies. *Pediatr. Drugs.* 2015; 17(6): 425–41.
<https://doi.org/10.1007/s40272-015-0149-x>
 10. Iozefovich O.V., Kharit S.M., Kaplina S.P., Gostev V.V., Sidorenko S.V., Kalinogorskaya O.S., et al. The prevalence of pertussis in long coughing children 6–17 years old, vaccinated at an early age with DTP-vaccine. *Epidemiologiya i vaksino-profilaktika.* 2012; 66(5): 56–9. (in Russian)
 11. Lobzin Yu.V., Kharit S.M. The problem of vaccination: a brief history, state-of-the-art, and ways of solution. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktual'nye voprosy.* 2014; (6): 30–7. (in Russian)
 12. Warfel J.M., Zimmerman L.I., Merkel T.J. Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014; 111(2): 787–92.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1314688110>
 13. Guiso N., Njamkepo E., Vié le Sage F., Zepp F., Meyer C.U., Abitbol V., et al. Long-term humoral and cell-mediated immunity after acellular pertussis vaccination compares favourably with whole-cell vaccines 6 years after booster vaccination in the second year of life. *Vaccine.* 2007; 25(8): 1390–7.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.10.048>
 14. Kandeil W., van den Ende C., Bunge E.M., Jenkins V.A., Ceregido M.A., Guignard A. A systematic review of the burden of pertussis disease in infants and the effectiveness of maternal immunization against pertussis. *Expert. Rev. Vaccines.* 2020; 19(7): 621–38. <https://doi.org/10.1080/14760584.2020.1791092>
 15. Karataev G.I., Sinyashina L.N., Medkova A.Yu., Semin E.G., Shevtsova Z.V., Matua A.Z., et al. Insertional inactivation of virulence operon in population of persistent *Bordetella pertussis* bacteria. *Genetika.* 2016; 52(4): 370–7.
<https://doi.org/10.1134/S102279541603008X> (in Russian)
 16. Sinyashina L.N., Semin E.G., Medkova A.Yu., Syundyukova R.A., Karataev G.I. Pre-clinical toxicity study and safety assessment of candidate live pertussis vaccine for intranasal administration. *Epidemiologiya i vaksino-profilaktika.* 2018; 17(6): 98–108.
<https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-98-108> (in Russian)
 17. Sinyashina L.N., Semin E.G., Medkova A.Yu., Syundyukova R.A., Karataev G.I. Pre-clinical study of protective potency of candidate recombinant live pertussis vaccine for intranasal administration. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2019; (3): 60–9.
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-3-60-69> (in Russian)
 18. Medkova A.Yu., Sinyashina L.N., Amichba A.A., Semin E.G., Shevtsova Z.V., Matua A.Z., et al. Preclinical studies of safety, immunogenicity and protective activity of attenuated *Bordetella pertussis* bacteria on the *Macaca mulatta* model. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2020; 97(4): 312–23.
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-3> (in Russian)
 19. Loch C., Papin J.F., Lecher S., Debie A.S., Thalen M., Solovay K., et al. Live attenuated pertussis vaccine BPZE1 protects baboons against *Bordetella pertussis* disease and infection. *J. Infect. Dis.* 2017; 216(1): 117–24.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jix254>
 20. Jahnmatz M., Amu S., Ljungman M., Wehlin L., Chiodi F., Mielcarek N., et al. B-cell responses after intranasal vaccination with the novel attenuated *Bordetella pertussis* vaccine strain BPZE1 in a randomized phase I clinical trial. *Vaccine.* 2014; 32(27): 3350–6.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.04.048>
 21. Thorstensson R., Trollfors B., Al-Tawil N., Jahnmatz M., Bergström J., Ljungman M., et al. A phase I clinical study of a live attenuated *Bordetella pertussis* vaccine — BPZE1; a single centre, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating study of BPZE1 given intranasally to healthy adult male volunteers. *PLoS One.* 2014; 9(1): e83449.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083449>
 22. Medkova A.Yu., Lidzheva A.A., Semin E.G., Sinyashina L.N., Syundyukova R.A., D'yakov I.N., et al. A clinical study of the safety and tolerability of live nasal vaccines for the prevention of pertussis. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv.* 2021; 10(1): 114–9. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-114-119> (in Russian)
 23. Medkova A.Yu., Alyapkina Yu.S., Sinyashina L.N., Amelina I.P., Alekseev G.I., Bokovoy Ya.I., et al. Detection of avirulent insertional *Bordetella pertussis* BVG – mutants in patients with pertussis and with upper respiratory tract infection and in seemingly healthy people. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya.* 2010; (4): 167–71.
<https://doi.org/10.3103/S0891416810040051> (in Russian)
 24. Medkova A.Yu., Sinyashina L.N., Rummyantseva Yu.P., Voronina O.L., Kunda M.S., Karataev G.I. Accumulation of avirulent *Bordetella pertussis* BVG mutants in the course of experimental whooping cough in mice. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya.* 2013; 28(4): 156–61.
<https://doi.org/10.3103/S0891416813040058>
 25. Nesterova Yu.V., Medkova A.Yu., Babachenko I.V., Semin E.G., Kalisnikova E.L., Sinyashina L.N., et al. Clinical-diagnostic value of *Bordetella pertussis* genetic markers in contact persons in familial foci. *Zhurnal infektologii.* 2019; 11(1): 17–24.
<https://doi.org/10.22625/2072-6732-2019-11-1-17-24> (in Russian)
 26. Kubrava D.T., Medkova A.Yu., Sinyashina L.N., Shevtsova Z.V., Matua A.Z., Kondzhariya I.G., et al. Cough of nonhuman primate. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk.* 2013; (8): 4–8.
 27. Lobzin Yu.V., Skripchenko N.V., Volzhanin V.M. New in the diagnosis, therapy, rehabilitation and prevention of infectious diseases in children (based on the results of the work of the Children's Scientific and Clinical Center for Infectious Diseases in 2016). *Zhurnal infektologii.* 2017; 9(4): 5–28. (in Russian)
 28. Warfel J.M., Beren J., Kelly V.K., Lee G., Merkel T.J. Nonhuman primate model of pertussis. *Infect. Immun.* 2012; 80(4): 1530–6. <https://doi.org/10.1128/iai.06310-11>
 29. van der Zee A., Schellekens J.F., Mooi F.R. Laboratory diagnosis of pertussis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2015; 28(4): 1005–26.
<https://doi.org/10.1128/cmr.00031-15>

Информация об авторах

Медкова Алиса Юрьевна — к.м.н., с.н.с. лаб. генетики бактерий НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1509-0622>

Лидзиева Алевтина Анатольевна — м.н.с. лаб. генетики бактерий НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1537-6444>

Information about the authors

Alisa Yu. Medkova — senior researcher, Laboratory of genetic of bacteria, Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1509-0622>

Alevtina A. Lidzheva — junior researcher, Laboratory of genetic of bacteria, Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1537-6444>

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

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

Сюндюкова Резида Анваровна — к.б.н., с.н.с. лаб. генетики бактерий НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5600-1967>

Снегирева Надежда Анатольевна — н.с. лаб. биосинтеза иммуноглобулинов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия; м.н.с. лаб. генетики бактерий НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5399-3224>

Чернышова Ирина Николаевна — к.м.н., с.н.с. лаб. биосинтеза иммуноглобулинов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия; н.с. лаб. генетики бактерий НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5053-2433>

Гаврилова Марина Викторовна — к.б.н., н.с. лаб. биосинтеза иммуноглобулинов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия; н.с. лаб. генетики бактерий ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6936-2486>

Бушкова Кристина Константиновна — м.н.с. лаб. биосинтеза иммуноглобулинов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4757-0751>

Колобухина Людмила Васильевна — д.м.н., профессор, г.н.с. лаб. респираторных вирусных инфекций с апробацией лекарственных средств НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5775-3343>

Кружкова Ирина Сергеевна — н.с. лаб. респираторных вирусных инфекций с апробацией лекарственных средств НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1983-481X>

Меркулова Лилия Николаевна — к.м.н., в.н.с. лаб. респираторных вирусных инфекций с апробацией лекарственных средств НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7260-0879>

Русанова Марина Геннадьевна — к.м.н., врач-инфекционист ИКБ № 1 ДЗМ, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5878-7200>

Дьяков Илья Николаевич[✉] — к.б.н., в.н.с., зав. лаб. биосинтеза иммуноглобулинов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия; н.с. лаб. медиаторов и эффекторов иммунитета НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, dyakov.ilya@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5384-9866>

Каратаев Геннадий Иванович — д.б.н., в.н.с., рук. лаб. генетики бактерий НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8771-6092>

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 18.06.2021;
принята к публикации 04.11.2021;
опубликована 25.12.2021

Evgeniy G. Semin — researcher, Laboratory of genetic of bacteria, Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6696-8362>

Lyudmila N. Sinyashina — D. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of genetic of bacteria, Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1708-5453>

Rezida A. Syundyukova — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of genetic of bacteria, Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5600-1967>

Nadezhda A. Snegireva — researcher, Laboratory of biosynthesis of immunoglobulins, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia; junior researcher, Laboratory of genetic of bacteria, Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5399-3224>

Irina N. Chernyshova — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of biosynthesis of immunoglobulins, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia; researcher, Laboratory of genetic of bacteria, Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5053-2433>

Marina V. Gavrilova — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Laboratory of biosynthesis of immunoglobulins, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia; researcher, Laboratory of genetic of bacteria, Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6936-2486>

Kristina K. Bushkova — junior researcher, Laboratory of biosynthesis of immunoglobulins, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4757-0751>

Lyudmila V. Kolobukhina — D. Sci. (Med.), professor, chief researcher, Laboratory of respiratory viral infections with approbation of medicines, Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5775-3343>

Irina S. Kruzhkova — researcher, Laboratory of respiratory viral infections with approbation of medicines, Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1983-481X>

Liliya N. Merkulova — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of respiratory viral infections with approbation of medicines, Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7260-0879>

Marina G. Rusanova — Cand. Sci. (Med.), infectious disease doctor, Infectious Clinical Hospital No. 1, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5878-7200>

Ilya N. Dyakov[✉] — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Head, Laboratory of biosynthesis of immunoglobulins, Research Institute of Vaccines and Serums named after I. I. Mechnikov, Moscow, Russia; researcher, Laboratory of immunity mediators and effectors, Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, dyakov.ilya@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5384-9866>

Gennadiy I. Karataev — D. Sci. (Biol.), Head, Laboratory Genetic of bacterial Federal State Budgetary Institution «Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8771-6092>

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 18.06.2021;
accepted for publication 04.11.2021;
published 25.12.2021

ОБЗОРЫ

Научный обзор

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-140>



Молекулярные детерминанты резистентности *Salmonella enterica* к антибиотикам

Павлова А.С.¹, Бочарова Ю.А.², Кулешов К.В.^{1✉}, Подколзин А.Т.¹, Чеботарь И.В.²

¹ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

²Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия

Аннотация

Нетифоидные штаммы *Salmonella enterica* представляют большую опасность для здоровья человека. Проблема сальмонеллёзов осложняется прогрессирующим распространением нечувствительности к антибиотикам среди клинических и сельскохозяйственных штаммов *S. enterica*. Настоящий обзор литературы обобщает современные сведения о механизмах устойчивости *S. enterica* к антибиотикам и иллюстрирует многообразие и сложность молекулярных систем, обеспечивающих антибиотикорезистентность (АР) у *S. enterica*. Описан спектр природной резистентности и тщательно охарактеризованы адаптивные (приобретённые) механизмы устойчивости к представителям основных классов антибиотиков, включая β-лактамы, фторхинолоны, аминогликозиды, тетрациклины, нитрофураны, сульфонамиды, фосфомицин, хлорамфеникол (левомицетин) и полимиксины (колистин). Перечислены генетические детерминанты резистентности, передающиеся горизонтальным путём. В обзоре проанализированы только те варианты молекулярных механизмов АР, клиническая значимость которых была доказана комплексом корректных генетических (секвенирование) и биохимических (подтверждение спектра гидролизуемых β-лактамов) исследований. Описаны общие характеристики устойчивости к антибиотикам у нетифоидных сальмонелл. У многих штаммов *S. enterica* наблюдаются сочетание различных механизмов АР и множественная резистентность. Поднят вопрос о неоднородности распространения резистентности среди различных групп/серотипов внутри вида *S. enterica*. В частности, некоторые клональные комплексы с признаками резистентности оказываются более успешными патогенами человека и животных. Сальмонеллы, как и большинство других бактерий, демонстрируют неканонический вид устойчивости к антибиотикам — биоплёночную резистентность, которая реализуется за счёт нескольких механизмов, главными из которых являются фильтрующая/сорбционная способность биоплёночного матрикса и трансформация биоплёночных клеток в дормантные и персистирующие формы.

Несмотря на то что функциональная значимость молекулярных ансамблей, определяющих устойчивость к антибиотикам, однотипна для всех энтеробактерий, конкретизация механизмов резистентности у сальмонелл является необходимым звеном для разработки молекулярно-диагностических систем оценки чувствительности сальмонелл к антимикробным препаратам.

Ключевые слова: обзор, *Salmonella enterica*, антибиотики, антибиотикорезистентность, гены

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках государственного задания по теме НИР № АААА-А21-121011990054-5 «Клинико-эпидемиологическая характеристика инфекционной патологии желудочно-кишечного тракта и ассоциированных состояний».

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

Для цитирования: Павлова А.С., Бочарова Ю.А., Кулешов К.В., Подколзин А.Т., Чеботарь И.В. Молекулярные детерминанты резистентности *Salmonella enterica* к антибиотикам. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(6):721–730.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-140>

Review article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-140>

Molecular determinants of antibiotic resistance in *Salmonella enterica* antibiotic resistance

Anastasia S. Pavlova¹, Yuliya A. Bocharova², Konstantin V. Kuleshov^{1✉}, Aleksandr T. Podkolzin¹, Igor V. Chebotar²

¹Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia;

²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Abstract

Nontyphoid strains of *Salmonella enterica* pose a great threat to human health. The problem of salmonellosis is aggravated compounded by the progressive spread of antibiotic resistance among clinical and agricultural strains of *S. enterica*. This literature review summarizes the current knowledge of the mechanisms of antibiotic resistance in *S. enterica* and illustrates the diversity and complexity of molecular systems providing antibiotic resistance. The spectrum of natural resistance is described and the adaptive (acquired) mechanisms of resistance to representatives of the main classes of antibiotics, including fluoroquinolones, aminoglycosides, tetracyclines, nitrofurans, sulfonamides, fosfomycin and chloramphenicol, are thoroughly characterized. Particular emphasis is placed on the analysis of the molecular genetic mechanisms of *S. enterica* resistance to representatives of the most important classes of antibiotics — β -lactams, and to reserve antibiotics — polymyxins (colistin). Genetic determinants of resistance, transmitted by a horizontal path route are also described. The review analyzes only those variants of the molecular mechanisms of antibiotic resistance where the clinical significance has been proven by a set of correct genetic (sequencing) and biochemical (confirmation of the spectrum of hydrolyzed β -lactams) studies. The main ways of regulating the expression of antibiotic resistance are also described. Many *S. enterica* strains exhibit a combination of different mechanisms of antibiotic resistance and have a multiple resistance. The question was raised about the heterogeneity of the distribution of resistance among different groups/serotypes within the *S. enterica* species. In particular, some clonal complexes with signs of resistance are more successful pathogens in humans and animals. *Salmonella*, like most other bacteria, exhibit a non-canonical type of antibiotic resistance — biofilm resistance, which is realized through several mechanisms, the main of which are the filtering/sorption capacity of the biofilm matrix and the transformation of biofilm cells into dormant and persistent forms.

Despite the fact that the functional significance of the molecular assemblies that determine antibiotic resistance is the same for all enterobacteria, the specification of the mechanisms of resistance in *Salmonella* is a necessary link for the development of molecular diagnostic systems for assessing the sensitivity to antimicrobial drugs.

Keywords: overview, *Salmonella enterica*, antimicrobials, antibiotic resistance, genes

Funding source. The work was carried out within the framework of the state assignment on the topic of research work No. AAAA-A21-121011990054-5 "Clinical and epidemiological characteristics of infectious pathology of the gastrointestinal tract and associated conditions".

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

For citation: Pavlova A.S., Bocharova Yu.A., Kuleshov K.V., Podkolzin A.T., Chebotar I.V. Molecular determinants of antibiotic resistance in *Salmonella enterica* antibiotic resistance. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(6):721–730. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-140>

Введение

Говоря о распространении антибиотикорезистентности (АР) бактерий, следует акцентировать внимание на видах, представляющих наибольшую опасность для здоровья человека. К числу таких патогенов принадлежат нетифоидные штаммы *Salmonella enterica*¹. Их эпидемиологическая и клиническая актуальность определяется несколькими

причинами. Во-первых, *Salmonella* занимает одну из лидирующих позиций среди всех пищевых бактериальных патогенов человека [1]. Только в США ежегодно сальмонеллёзом заболевают более 1 200 000 человек, у 23 000 из которых болезнь протекает в тяжёлой форме и требует госпитализации². Заболеваемость гастроинтестинальным сальмонеллёзом в Европейском союзе в 2018 г. составила 20,1 на 100 тыс. населения [2]. Распространённость вирулентных клонов *S. enterica* сохраняется на

¹ Centers for Disease Control and Prevention (CDC). National Salmonella Surveillance Annual Report, 2011. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC; 2013. Available at: <https://www.cdc.gov/ncezid/dfwed/PDFs/salmonella-annual-report-2011-508c.pdf>

² Salmonella data now at your fingertips. CDC Press Release; 2014. Available at: <https://www.cdc.gov/media/releases/2014/p0326-salmonella-data.html>

высоком уровне, что подтверждается статистикой смертности и заболеваемости некишечными (инвазивными) формами сальмонеллёза, летальность при которых доходит до 21%, а у иммунокомпрометированных пациентов — до 30% [3]. Во-вторых, генетическая гетерогенность и выраженная способность к полигостальной адаптации сальмонелл пока не даёт реальных результатов управления сальмонеллёзной инфекцией при помощи иммунопрофилактики в естественных резервуарах. В-третьих, экологическая пластичность сальмонеллы позволяет ей адаптироваться к условиям массового применения антимикробных препаратов не только в здравоохранении, но и в сельхозпроизводстве, что вызывает глобальное распространение АР-штаммов и усиливает риск их переноса в организм человека [4–6]. Именно устойчивые к антибиотикам формы *S. enterica* расцениваются экспертами Центра по контролю и профилактике заболеваний США в качестве наиболее серьёзной угрозы для современного здравоохранения³.

Первостепенная задача, которую ставит Всемирная организация здравоохранения в рамках глобальной борьбы с АР, формулируется как «улучшение понимания вопросов устойчивости к противомикробным препаратам»⁴.

Цель настоящего обзора — показать многообразие и сложность молекулярных механизмов АР *S. enterica*, понимание которых необходимо для разработки качественных молекулярно-диагностических систем для оценки устойчивости сальмонелл к антимикробным препаратам. В обзоре перечислены только те варианты молекулярных механизмов АР, которые были доказаны комплексом корректных генетических (секвенирование) и биохимических (подтверждение спектра гидролизуемых β-лактамов) исследований.

Напомним, что все известные механизмы устойчивости бактерий к антибиотикам включают: нарушение доставки антибиотика до его мишени, ферментативную инактивацию антибиотика, модификацию/защиту мишени, активное выведение (эффлюкс) антибиотика из бактериальной клетки, биоплёночную АР, формирование устойчивости за счёт трансформации в персистирующие формы [7–9].

Природная резистентность

Согласно заключению экспертов Европейского комитета по тестированию антимикробной резистентности, *S. enterica* обладает природной (видовой)

резистентностью к бензилпенициллину, гликопептидам, линкозаминам, стрептограминам, рифампицину, даптомицину, линезолиду, фузидину. Интересная ситуация сложилась с макролидами. Несмотря на то что *S. enterica* природно устойчива к макролидам (главным образом за счёт эффлюкс-механизмов), применение азитромицина в терапии брюшного тифа и паратифов считается возможным⁵.

Приобретённая (адаптивная) резистентность

Резистентность к β-лактамным антибиотикам

Мишенями для β-лактамных антибиотиков являются участвующие в синтезе пептидогликана ферменты (транс- и карбоксипептидазы), которые названы пенициллинсвязывающими белками (penicillin-binding proteins, PBP). В клетке грамотрицательных бактерий они локализованы в периплазматическом пространстве, следовательно β-лактамам для взаимодействия с мишенью необходимо транспортироваться через наружную мембрану и не нужно проникать через цитоплазматическую мембрану. Поэтому бактерии не используют для защиты от β-лактамов эффлюкс-помпы цитоплазматической мембраны, которые откачивают субстанции из цитоплазмы в периплазму. Эффлюкс-системы, обеспечивающие откачку антибиотика из периплазматического пространства, действуют очень эффективно и успешно используются бактериями для выживания при терапии β-лактамами. Чтобы снизить концентрацию β-лактамных антибиотиков в периплазме сальмонеллы, успешно используют два механизма: блокаду поступления извне и удаление их из периплазмы наружу. К подавлению поступления извне приводит поломка или снижение экспрессии поринов, через которые происходит транспорт β-лактамов. К таким поринам *S. enterica* принадлежат OmpF, OmpD, Ail/OmpX-подобный порин [10–12]. Удаление из периплазмы β-лактамов у *S. enterica* реализуется посредством гиперактивности эффлюкс-систем AcrAB-TolC [13, 14].

Однако самым сильным инструментом нейтрализации β-лактамов у *S. enterica*, как и у других грамотрицательных бактерий, являются ферменты β-лактамазы [15–21]. Доказано, что сальмонелла может продуцировать β-лактамазы всех четырех типов классификации Ambler [21]:

- класс А — КРС (карбапенемаза), ТЕМ (β-лактамаза расширенного спектра или БЛРС), СТХ-М (БЛРС), SHV (БЛРС);

³ CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services; 2019. <http://doi.org/10.15620/cdc:82532>

⁴ World Health Organization. Global action plan on antimicrobial resistance. WHO, Library Cataloguing-in-Publication Data, 2015. Retrieved from <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en> (дата обращения 26.02.2020)

⁵ The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST advice on intrinsic resistance and exceptional phenotypes v 3.2, 2020. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Expert_Rules/2020/Intrinsic_Resistance_and_Unusual_Phenotypes_Tables_v3.2_20200225.pdf (дата обращения 26.02.2020)

- класс В — GIM (карбапенемаза), VIM (карбапенемаза), IMP (карбапенемаза), NDM (карбапенемаза), SPM (карбапенемаза);
- класс С — CMY (цефалоспориноаза), FOX (БЛРС/слабая карбапенемаза);
- класс D — OXA (спектр гидролизуемых β-лактамов различен — от оксациллина до карбапенемов).

Выработка β-лактамаз у сальмонелл чаще носит постоянный (конститутивный) характер, реже она является индуцибельной.

Модификация мишени, защищающая *S. enterica* от β-лактамовых антибиотиков, проявляется в виде мутаций пенициллинсвязывающих белков RVP3, RVP4 and RVP6 [22]. Для *S. enterica* отсутствуют корректно доказанные данные о возможности резистентности к β-лактамам за счёт экранирования мишеней.

Резистентность к фторхинолонам

Мишени фторхинолонов — ДНК-гираза, топоизомераза IV — находятся внутри клеток, поэтому для того, чтобы связаться с мишенями грамотрицательных бактерий, фторхинолоны должны транспортироваться через две мембраны — цитоплазматическую и наружную. Если транслокация фторхинолонов через цитоплазматическую мембрану не вызывает затруднений, то проникновение через наружную мембрану, содержащую плотно расположенные липополисахариды (ЛПС), возможно только через специфические порины. Для того чтобы понизить эффективность фторхинолонов, бактерии используют относительно простые эффлюкс-помпы, локализованные исключительно в цитоплазматической мембране и обеспечивающие откачку антибиотика из цитоплазмы в периплазму со скоростью, превышающей диффузию фторхинолона в обратном направлении. Такой механизм характерен для большинства грамотрицательных бактерий в отношении антибиотиков, мишени которых находятся в цитоплазматическом пространстве (фторхинолоны, макролиды, тетрациклины, хлорамфеникол).

Для *S. enterica* доказано существование фторхинолон-резистентности, зависимой от дефекта поринов наружной мембраны OmpF, через которые происходит транспорт фторхинолонов [23]. Резистентность *S. enterica* к фторхинолонам за счёт эффлюкс-механизмов может возникнуть при гиперфункции хромосомно-кодируемых мульти-субстратных эффлюкс-систем AcrAB-TolC, MdtK, MdfA, а также за счёт эффлюкс-помп цитоплазматической мембраны, oqxAB и qerA, гены которых локализованы в плазмидах и передаются горизонтальным путём [24, 25]. Инактивация фторхинолонов у сальмонеллы осуществляется аминогликозид-ацетилтрансферазой AAC(6′)-Ib-cr. Устойчивость *S. enterica* за счёт модификации мишени для фтор-

хинолонов возникает из-за мутаций в генах ДНК-гиразы (*gyrA*, *gyrB*) и топоизомеразы IV (*parC*, *gyrE*). Кроме этого, мишень может быть защищена за счёт особых белков, экранирующих ДНК-гиразу и топоизомеразу IV [25]. Гены, которые кодируют экранирующие белки (гены семейства *qnr*, включая *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC*, *qnrD*), являются плазмидными и переносятся горизонтально.

Резистентность к аминогликозидам

Мишенью для аминогликозидов у *S. enterica* является 16S рРНК в составе 30S субъединицы рибосомы. Устойчивость к аминогликозидам за счёт эффлюкса реализуется у *S. enterica* при гиперфункции эффлюкс-системы AcrAD [24]. Ферментативная инактивация аминогликозидов у сальмонеллы осуществляется аминогликозид-ацетилтрансферазой (AAC(6′)-Ib) и аминогликозид-фосфотрансферазой [26, 27]. Передача генов указанных ферментов осуществляется путём плазмидного переноса.

Модификация мишени для аминогликозидов (16S рРНК) может происходить у сальмонеллы через два противоположно направленных механизма: гиперметилирование и полную блокаду метилирования в позиции G527 16S rRNA. Гиперметилирование детерминируется плазмидно-приобретёнными 16S рРНК-метилтрансферазами, отсутствие метилирования является следствием потери гена *gidB* [28, 29]. Для *S. enterica* отсутствуют корректно доказанные данные возникновения резистентности к аминогликозидам за счёт нарушения пориновой проницаемости и механизмов защиты мишени.

Резистентность к тетрациклинам

Мишенью для тетрациклинов у *S. enterica* является 16S рРНК в составе 30S субъединицы рибосомы, тигециклин имеет дополнительную мишень — 23S рРНК. Устойчивость к тетрациклинам за счёт эффлюкс-механизмов осуществляется у *S. enterica* при гиперактивации мультисубстратной эффлюкс-системы AcrAB-TolC, а также эффлюкс-помп цитоплазматической мембраны MdtK, MdfA (синоним — CmlA/Cmr), TetA, TetB, TetC, TetD, TetG и TetL [24, 30–32]. Гены эффлюкс-помп цитоплазматической мембраны *mdtK*, *mdfA* (синоним — *cmlA/cmr*), *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetG*, *tetL* являются плазмидными и могут передаваться горизонтальным путём. Тетрациклины могут инактивироваться под действием флавинозависимой монооксигеназы TetX, которая приводит к их деструкции через гидроксильное/окисление [32]. Гены этого фермента (*tetX*) переносятся плазмидами и могут передаваться горизонтальным путём.

У *S. enterica* может присутствовать механизм защиты мишени, который реализуется при помощи протеина TetM, который катализирует GTP-зависимое освобождение рибосом от тетрациклинов [32].

Гены *tetM* также являются плазмидными, что обеспечивает возможность их горизонтального переноса. Для *S. enterica* отсутствуют корректно доказанные данные о молекулярных механизмах устойчивости к тетрациклинам за счёт модификации мишени и нарушения пориновой проницаемости.

Резистентность к хлорамфениколу (левомецетину)

Мишенью для хлорамфеникола является 23S рРНК в составе 50S субъединицы рибосомы. Достаточное для проявления резистентности снижение концентрации хлорамфеникола в цитоплазме *S. enterica* может возникать вследствие поломки порина OmpF, через который хлорамфеникол поступает в клетку, а также за счёт гиперактивации мультисубстратной эффлюкс-системы AcrAB-TolC и эффлюкс-помп цитоплазматической мембраны Cml, FloR [24, 33]. Гены эффлюкс-помп *cml*, *floR* являются плазмидными и передаются горизонтально. Инактивация хлорамфеникола сальмонеллами ферментируется СНL-ацетилтрансферазами, гены которых (*cat*-гены) тоже переносятся плазмидами [34]. Возможность модификации мишени хлорамфеникола у *S. enterica* вследствие мутации показана только в экспериментах *in vitro*. Ввиду консервативности сайта связывания хлорамфеникола резистентность к хлорамфениколу, связанная с модификацией мишени, у диких и клинических штаммов *S. enterica* практически не встречается. Для *S. enterica* отсутствуют корректно доказанные данные о возникновении резистентности к хлорамфениколу путём защиты мишени.

Резистентность к фосфомицину

Мишенью для фосфомицина служит фермент UDP-N-ацитилглюкозамин-енолпирувил трансфераза (синоним — энзим MurA), участвующий в синтезе пептидогликана. Фосфомицин поступает внутрь бактериальной клетки при помощи белков-транспортёров, обеспечивающих активный транспорт фосфомицина (инфлюкс) через наружную мембрану. Доказано, что резистентность к фосфомицину может возникать из-за подавления функции GlpT-транспортёра и гипотетического UhpT-транспортёра фосфомицина, а также из-за мутаций в их генах *glpT* и *uhpT* [35, 36].

Предполагается, что резистентность к фосфомицину может возникать за счёт гиперфункции мультисубстратной эффлюкс-системы MdtEF-Tol, активируемой через глобальный регулятор CRP [35]. Фосфомицин может быть инактивирован ферментативным путём под воздействием глутатион-S-трансферазы FosA7, разрушающей эпоксидное кольцо фосфомицина [37]. Гены этого фермента *fosA* являются плазмидными и передаются горизонтальным путём. Для *S. enterica* отсутствуют коррек-

тно доказанные данные развития фосфомицин-резистентности за счёт модификации либо защиты мишени.

Резистентность к нитрофуранам

По механизму действия нитрофураны не похожи на другие антибиотики. Попадая в микробную клетку, нитрофураны деградируют под действием бактериальных кислород-независимых нитроредуктаз, кодируемых генами *nfsA* и *nfsB*. Продукты распада нитрофуранов повреждают рибосомальные протеины, ДНК и другие жизненно важные для бактерии молекулы. Показано, что гиперфункция мультисубстратных эффлюкс-систем *S. enterica* MdsABC и AcrAB-TolC может приводить к развитию устойчивости к нитрофуранам [21, 35].

Во многом механизмы возникновения резистентности *S. enterica* к нитрофуранам остаются неизвестными. В частности, для сальмонеллы отсутствуют корректные данные о том, что в возникновении устойчивости к нитрофуранам участвуют системы транспорта внутрь клетки через наружную мембрану. Нет данных о возможности *S. enterica* катализировать инактивацию нитрофуранов. Однако мишени могут быть защищены косвенным образом — путём инактивации кислород-независимых нитроредуктаз за счёт мутаций в кодирующих генах *nfsA* и *nfsB* [38].

Резистентность к сульфонамидам, триметоприму

Сульфонамиды воздействуют на дигидроптероат-синтетазу, триметоприм — на дигидрофолат-редуктазу. Повреждение обеих мишеней вызывает нарушение синтеза тетрагидрофолиевой кислоты, являющейся предшественником тимидина, что приводит к подавлению синтеза нуклеиновых кислот и блокаде метаболизма бактериальной клетки.

Важнейший механизм резистентности к этой группе антимикробных препаратов у *S. enterica* связан с приобретением плазмидных генов, кодирующих ферменты-мишени с высокой устойчивостью к сульфонамидам/триметоприму: гены семейства *sul* кодируют выработку невосприимчивой к сульфонамидам дигидроптероат-синтазы, а гены семейства *dfi* детерминируют синтез резистентной к триметоприму дегидрофолат-редуктазы [34, 39].

Резистентность к колистину (полимиксинам)

Полимиксины повреждают мембранные структуры грамотрицательных бактерий, включая главную мишень — ЛПС. Колистин-резистентность *S. enterica* определяется двумя основными механизмами. Первый вариант устойчивости не передаётся горизонтально и возникает вследствие мутаций в генах семейства *pmr*, которые регулирует синтез ЛПС [40]. Второй механизм более опасен с эпиде-

миологической точки зрения: его детерминирует плазмид-переносимый ген *mcr-1*, который кодирует фермент фосфатидилэтаноламинтрансферазу, нарушающую нормальный синтез ЛПС [41].

В 2012 г. Y. Agero и соавт. предположили, что снижение чувствительности к колистину связано с конкретными сероварами *S. enteritidis* и *S. Dublin*, принадлежащими к одной O-группе (O:1,9,12) [42]. Дальнейшие исследования в этой области показали, что устойчивость к колистину сероваров группы D связана с эпитопом O-антигена, определяющим их антигенную структуру [43].

Некоторые исследователи предполагают, что у сальмонеллы присутствуют и другие механизмы колистин-резистентности, однако корректных доказательств этого пока не существует.

Общие характеристики антибиотикорезистентности нетифоидных сальмонелл

В зависимости от молекулярного механизма адаптивная резистентность к антибиотикам у *S. enterica* может экспрессироваться постоянно либо может быть индуцибельной, т.е. проявляться только в стрессовых условиях при контакте с антибиотиками. Примером индуцибельной резистентности является гиперэкспрессия эффлюкс-систем (AcrAB-TolC, AcrAD, MdtEF), которая может сочетаться со снижением экспрессии генов поринов наружной мембраны. Индукция гиперэкспрессии эффлюкс-систем зависит от глобальной регуляции сигнальных систем, в частности системы кворум-сенсинга SdiA-LuxS [44]. Это лишь частный случай регуляции. Сложные сети внутриклеточных сигнальных путей предусматривают множество других вариантов индукции AP.

У многих штаммов *S. enterica* наблюдается сочетание различных механизмов AP [45]. Это касается как комбинации различных механизмов резистентности к одному антибиотику, так и феномена кросс-резистентности, когда развитие устойчивости к одной группе антибиотиков сопровождается снижением чувствительности к другим видам антимикробных препаратов.

Интересным фактом является неоднородность распространения резистентности среди штаммов внутри вида *S. enterica*. Некоторые клональные комплексы с признаками резистентности оказываются более успешными — об этом свидетельствует их глобальное преобладание в качестве зоопатогенов и патогенов человека. Примером такого успеха является *S. enterica*, серотип Kentucky, ST198-клон [46]. Он начал своё восхождение в начале 2000-х гг. (изолирован во Франции от пациента с сальмонеллёзом, вернувшегося из Египта) с приобретения резистентности к фторхинолонам. В течение нескольких лет, успешно используя для расширения спектра рези-

стентности набор транспозонов и приобретённых от других энтеробактерий плазмид, клон *S. enterica* Kentucky ST198 получил глобальное распространение в странах Европы, Америки, Африки, Ближнего Востока и Юго-Восточной Азии. Вопрос о том, каковы молекулярные основы успеха подобных клонов, пока остаётся без ответа. Эксперты ограничиваются лишь общими рассуждениями о фитнес-механизмах причин клонального успеха.

Повышенная устойчивость к антибиотикам и дезинфектантам наблюдается у сальмонелл, находящихся в составе биоплёнок [47]. Биоплёночная резистентность реализуется за счёт нескольких механизмов, главными из которых являются (1) фильтрующая и сорбционная способность биоплёночного матрикса и (2) трансформация биоплёночных клеток в дормантные и персистирующие формы [7, 48].

Сальмонеллы, в том числе не обладающие способностью вызывать манифестные формы заболеваний у человека, но представленные в продукции животноводства, способны выполнять роль вектора в трансфере генетических детерминант AP нормальной микрофлоры кишечника человека. С другой стороны, сальмонеллы сами являются реципиентом генетического материала от других микроорганизмов. Несмотря на потенциальную возможность горизонтального переноса мобильных генетических элементов при конъюгации, трансформации и трансдукции, основным механизмом в переносе плазмид и транспозонов является конъюгация [49]. Возможности горизонтального переноса мобильных генетических элементов не ограничиваются филогенетически близкими таксонами микроорганизмов. Например, для транспозонов из семейства Tn916 была установлена возможность конъюгативного переноса между грампозитивными и грамотрицательными бактериями [50]. Горизонтальный перенос активно используется сальмонеллами, что подтверждается, в частности, анализом состава плазмид *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* (плазмиды pU302L), свидетельствующим об активном обмене генетическим материалом с таксономически близкими микроорганизмами [51].

Заключение

Анализ информации о механизмах AP *S. enterica* позволяет сделать вывод о том, что в целом устойчивость сальмонелл реализуется согласно закономерностям, которые не являются уникальными. Функциональная значимость молекулярных ансамблей, определяющих резистентность, однотипна для всех энтеробактерий. Однако это не уменьшает важности изучения структурных особенностей молекулярно-генетических детерминант резистентности у *S. enterica*, знание которых необходимо для решения эпидемиологических задач, разработки

диагностических инструментов, а также для прогнозирования эволюции резистентности сальмонелл в локальных и глобальных масштабах. Острота проблемы особенно ярко проявляется в контексте трансформации сальмонеллы в резистентного «супермикроба» как следствия неконтролируемого применения антибиотиков в сельскохозяйственном производстве [6, 52]. Надеемся, что фактическая информация о молекулярных детерминантах AP *S. enterica*, изложенная в настоящем обзоре, сможет заполнить пробелы, существующие в современной научной периодике.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Scallan E., Hoekstra R.M., Angulo F.J., Tauxe R.V., Widdowson M.A., Roy S.L., et al. Foodborne illness acquired in the United States — major pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(1): 7–15. <https://doi.org/10.3201/eid1701.p11101>
2. The European Union one health 2018 zoonoses report. *EFSA J.* 2019; 17(12): e05926. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>
3. Dhanoa A., Fatt Q.K. Non-typhoidal *Salmonella* bacteraemia: epidemiology, clinical characteristics and its' association with severe immunosuppression. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2009; 8: 15. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-8-15>
4. Van Boeckel T.P., Brower C., Gilbert M., Grenfell B.T., Levin S.A., Robinson T.P., et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015; 112(18): 5649–54. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
5. Economou V., Gousia P. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infect. Drug Resist.* 2015; 8: 49–61. <http://doi.org/10.2147/IDR.S55778>
6. Chen H.M., Wang Y., Su L.H., Chiu C.H. Nontyphoid *Salmonella* infection: microbiology, clinical features, and antimicrobial therapy. *Pediatr. Neonatol.* 2013; 54(3): 147–52. <http://doi.org/10.1016/j.pedneo.2013.01.010>
7. Страчунский Л.С., Белоусов Ю.В., Козлов С.Н. *Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии*. Смоленск: МакМаХ; 2007.
8. Чеботарь И.В., Маянский А.Н., Кончакова Е.Д., Лазарева А.В., Чистякова В.П. Антибиотикорезистентность биоплёночных бактерий. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2012; 14(1): 51–8.
9. Чеботарь И.В., Бочарова Ю.А., Гурьев А.С., Маянский Н.А. Стратегии выживания бактерий в условиях контакта с антибиотиками. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65(2): 116–21. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-116-121>
10. Uddin M.J., Ahn J. Characterization of β -lactamase and efflux pump-mediated multiple antibiotic resistance in *Salmonella typhimurium*. *Food Sci. Biotechnol.* 2018; 27(3): 921–8. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0317-1>
11. Fernández J., Guerra B., Rodicio M.R. Resistance to carbapenems in non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars from humans, animals and food. *Vet. Sci.* 2018; 5(2): 40. <https://doi.org/10.3390/vetsci5020040>
12. Hu W.S., Lin J.F., Lin Y.H., Chang H.Y. Outer membrane protein STM3031 (Ail/OmpX-like protein) plays a key role in the ceftriaxone resistance of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Agents Chemother.* 2009; 53(8): 3248–55. <https://doi.org/10.1128/AAC.00079-09>
13. Nikaido H., Basina M., Nguyen V.Y., Rosenberg E.Y. Multidrug efflux pump AcrAB of *Salmonella typhimurium* excretes only those β -lactam antibiotics containing lipophilic side chains. *J. Bacteriol.* 1998; 180(17): 4686–92. <https://doi.org/10.1128/jb.180.17.4686-4692.1998>
14. Saw H.T.H., Webber M.A., Mushtaq S., Woodford N., Pidcock L.J.V. Inactivation or inhibition of AcrAB-TolC increases resistance of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* to carbapenems. *J. Antimicrob. Chemother.* 2016; 71(6): 1510–9. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw028>
15. Tate H., Folster J.P., Hsu C.H., Chen J., Hoffmann M., Li C., et al. Comparative analysis of extended-spectrum- β -lactamase CTX-M-65-producing *Salmonella enterica* serovar *Infantis* isolates from humans, food animals, and retail chickens in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017; 61(7): e00488-17. <http://doi.org/10.1128/AAC.00488-17>
16. Miriagou V., Tzouveleki L.S., Rossiter S., Tzelepi E., Angulo F.J., Whichard J.M. Imipenem resistance in a *Salmonella* clinical strain due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47(4): 1297–300. <http://doi.org/10.1128/AAC.47.4.1297-1300.2003>
17. Carroll L.M., Wiedmann M., den Bakker H., Siler J., Warchoczek S., Kent D., et al. Whole-genome sequencing of drug-resistant *Salmonella enterica* isolates from dairy cattle and humans in New York and Washington states reveals source and geographic associations. *Appl. Environ. Microbiol.* 2017; 83(12): e00140-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00140-17>
18. Yates C., Amyes S. Extended-spectrum β -lactamases in non-typhoidal *Salmonella* spp. isolated in the UK are now a reality: why the late arrival? *J. Antimicrob. Chemother.* 2005; 56(2): 262–4. <https://doi.org/10.1093/jac/dki237>
19. Usha G., Chunderika M., Prashini M., Willem S.A., Yusuf E.S. Characterization of extended-spectrum β -lactamases in *Salmonella* spp. at a tertiary hospital in Durban, South Africa. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 62(1): 86–91. <http://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.04.014>
20. Fischer J., Schmoger S., Jahn S., Helmuth R., Guerra B. NDM-1 carbapenemase-producing *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Corvallis* isolated from a wild bird in Germany. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013; 68(12): 2954–6. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt260>
21. Ambler R.P. The structure of β -lactamases. *Philos. Trans R. Soc. Lond.* 1980; 289: 321–31. <https://doi.org/10.1098/rstb.1980.0049>
22. Sun S., Selmer M., Andersson D.I. Resistance to β -lactam antibiotics conferred by point mutations in penicillin-binding proteins PBP3, PBP4 and PBP6 in *Salmonella enterica*. *PLoS One*. 2014; 9(5): e97202. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097202>
23. Vidovic S., An R., Rendahl A. Molecular and physiological characterization of fluoroquinolone-highly resistant *Salmonella enteritidis* strains. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 729. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00729>
24. Andersen J., He G.X., Kakarla P., Ranjana K.C.R., Kumar S., Lakra W.S., et al. Multidrug efflux pumps from *Enterobacteriaceae*, *Vibrio cholerae* and *Staphylococcus aureus* bacterial food pathogens. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2015; 12(2): 1487–547. <https://doi.org/10.3390/ijerph120201487>
25. Cuyper W.L., Jacob J., Wong V., Klemm E.J., Deborggraeve S., Puyvelde S.V. Fluoroquinolone resistance in *Salmonella*: insights by whole-genome sequencing. *Microb. Genom.* 2018; 4(7): e000195. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000195>
26. Magalhães M.L., Vetting M.W., Gao F., Freiburger L., Auclair K., Blanchard J.S. Kinetic and structural analysis of bisubstrate inhibition of the *Salmonella enterica* aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase. *Biochemistry.* 2008; 47(2): 579–84. <https://doi.org/10.1021/bi701957c>
27. Woegerbauer M., Zeininger J., Springer B., Hufnagl P., Indra A., Korschneck I., et al. Prevalence of the aminoglycoside phosphotransferase genes aph (3')-IIIa and aph (3')-IIa in

- Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* and *Staphylococcus aureus* isolates in Austria. *J. Med. Microbiol.* 2014; 63(2): 210–7. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.065789-0>
28. Wachino J.I., Arakawa Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug Resist. Updat.* 2012; 15(3): 133–48. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2012.05.001>
 29. Mikheil D.M., Shippey D.C., Eakley N.M., Okwumabua O.E., Fadl A.A. Deletion of gene encoding methyltransferase (gidB) confers high-level antimicrobial resistance in *Salmonella*. *J. Antibiot.* 2012; 65(4): 185–92. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.5>
 30. Roberts M.C. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol. Rev.* 1996; 19(1): 1–24. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1996.tb00251.x>
 31. Nishino K., Latifi T., Groisman E.A. Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Mol. Microbiol.* 2006; 59(1): 126–41. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04940.x>
 32. Chopra I., Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2001; 65(2): 232–60. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001>
 33. Toro C.S., Lobos S.R., Calderon I., Rodríguez M., Mora G.C. Clinical isolate of a porinless *Salmonella typhi* resistant to high levels of chloramphenicol. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1990; 34(9): 1715–9. <https://doi.org/10.1128/AAC.34.9.1715>
 34. Schwarz S., Kehrenberg C., Doublet B., Cloeckaert A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol. Rev.* 2004; 28(5): 519–42. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.04.001>
 35. Khatoon A., Malik H.M.T., Aurongzeb M., Raza S.A., Karim A. Draft genome of a macrolide resistant XDR *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A strain using a shotgun sequencing approach. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2019; 19: 129–31. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.09.001>
 36. Island M.D., Wei B.Y., Kadner R.J. Structure and function of the uhp genes for the sugar phosphate transport system in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 1992; 174(9): 2754–62. <https://doi.org/10.1128/jb.174.9.2754-2762.1992>
 37. Rehman M.A., Yin X., Persaud-Lachhman M.G., Diarra M.S. First detection of a fosfomycin resistance gene, fosA7, in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolated from broiler chickens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017; 61(8): e00410-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00410-17>
 38. García V., Montero I., Bances M., Rodicio R., Rodicio M.R. Incidence and genetic bases of nitrofurantoin resistance in clinical isolates of two successful multidrug-resistant clones of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*: pandemic “DT 104” and pUO-StVR2. *Microb. Drug Resist.* 2017; 23(4): 405–12. <https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0227>
 39. Matayoshi M., Kitano T., Sasaki T., Nakamura M. Resistance phenotypes and genotypes among multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar *Choleraesuis* strains isolated between 2008 and 2012 from slaughter pigs in Okinawa Prefecture, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 2015; 77(6): 705–10. <https://doi.org/10.1292/jvms.14-0683>
 40. Sun S., Negrea A., Rhen M., Andersson D.I. Genetic analysis of colistin resistance in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53(6): 2298–305. <https://doi.org/10.1128/AAC.01016-08>
 41. Lima T., Domingues S., Da Silva G.J. Plasmid-mediated colistin resistance in *Salmonella enterica*: A review. *Microorganisms.* 2019; 7(2): 55. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7020055>
 42. Agerso Y., Torpdahl M., Zachariassen C., Seyfarth A., Hammerum A.M., Nielsen E.M. Tentative colistin epidemiological cut-off value for *Salmonella* spp. *Foodborne Pathog. Dis.* 2012; 9(4): 367–9. <https://doi.org/10.1089/fpd.2011.1015>
 43. Ricci V., Zhang D., Teale C., Piddock L.J.V. The O-antigen epitope governs susceptibility to Colistin in *Salmonella enterica*. *mBio.* 2020; 11(1): e02831-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.02831-19>
 44. Ahmer B.M.M. Cell-to-cell signalling in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* 2004; 52(4): 933–45. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04054.x>
 45. McDermott P.F., Zhao S., Tate H. Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella*. *Microbiol. Spectrum.* 2018; 6(4): ARBA-0014-2017. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0014-2017>
 46. Le Hello S., Hendriksen R.S., Doublet B., Fisher I., Nielsen E., Whichard J.M., et al. International spread of an epidemic population of *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198 resistant to ciprofloxacin. *J. Infect. Dis.* 2011; 204(5): 675–84. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir409>
 47. Cadena M., Kelman T., Marco M.L., Pitesky M. Understanding antimicrobial resistance (AMR) profiles of *Salmonella* biofilm and Planktonic bacteria challenged with disinfectants commonly used during poultry processing. *Foods.* 2019; 8(7): 275. <https://doi.org/10.3390/foods8070275>
 48. Чеботарь И.В., Маянский А.Н., Маянский Н.А. Матрикс микробных биопленок. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2016; 18(1): 9–19.
 49. von Wintersdorff C.J.H., Penders J., van Niekerk J.M., Mills N.D., Majumder S., van Alphen L.B., et al. Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Front. Microbiol.* 2016; 7: 173. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173>
 50. Bertram J., Strätz M., Dürre P. Natural transfer of conjugative transposon Tn916 between gram-positive and gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 1991; 173: 443–8. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.443-448.1991>
 51. Chen C.Y., Nace G.W., Solow B., Fratamico P. Complete nucleotide sequences of 84.5- and 3.2-kb plasmids in the multi-antibiotic resistant *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* U302 strain G8430. *Plasmid.* 2007; 57: 29–43. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2006.05.005>
 52. Michael G.B., Freitag C., Wendlandt S., Christopher Eidam C., Feßler A.T., Lopes G.V., et al. Emerging issues in antimicrobial resistance of bacteria from food-producing animals. *Future Microbiol.* 2015; 10(3): 427–43. <https://doi.org/10.2217/FMB.14.93>

REFERENCES

1. Scallan E., Hoekstra R.M., Angulo F.J., Tauxe R.V., Widdowson M.A., Roy S.L., et al. Foodborne illness acquired in the United States – major pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(1): 7–15. <https://doi.org/10.3201/eid1701.p11101>
2. The European Union one health 2018 zoonoses report. *EFSA J.* 2019; 17(12): e05926. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>
3. Dhanoa A., Fatt Q.K. Non-typhoidal *Salmonella* bacteraemia: epidemiology, clinical characteristics and its' association with severe immunosuppression. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2009; 8: 15. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-8-15>
4. Van Boeckel T.P., Brower C., Gilbert M., Grenfell B.T., Levin S.A., Robinson T.P., et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015; 112(18): 5649–54. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
5. Economou V., Gousia P. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infect. Drug Resist.* 2015; 8: 49–61. <http://doi.org/10.2147/IDR.S55778>

6. Chen H.M., Wang Y., Su L.H., Chiu C.H. Nontyphoid *Salmonella* infection: microbiology, clinical features, and antimicrobial therapy. *Pediatr. Neonatol.* 2013; 54(3): 147–52. <http://doi.org/10.1016/j.pedneo.2013.01.010>
7. Strachunskiy L.S., Belousov Yu.V., Kozlov S.N. *Practical Guide to Anti-Infective Chemotherapy [Prakticheskoe rukovodstvo po antiinfektsionnoy khimioterapii]*. Smolensk: MakMaKh; 2007. (in Russian)
8. Chebotar' I.V., Mayanskiy A.N., Konchakova E.D., Lazareva A.V., Chistyakova V.P. Antimicrobial resistance of bacteria in biofilms. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya.* 2012; 14(1): 51–8. (in Russian)
9. Chebotar' I.V., Bocharova Yu.A., Gur'ev A.S., Mayanskiy N.A. Bacteria survival strategies in contact with antibiotics. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2020; 65(2): 116–21. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-116-121> (in Russian)
10. Uddin M.J., Ahn J. Characterization of β -lactamase-and efflux pump-mediated multiple antibiotic resistance in *Salmonella Typhimurium*. *Food Sci. Biotechnol.* 2018; 27(3): 921–8. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0317-1>
11. Fernández J., Guerra B., Rodicio M.R. Resistance to carbapenems in non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars from humans, animals and food. *Vet. Sci.* 2018; 5(2): 40. <https://doi.org/10.3390/vetsci5020040>
12. Hu W.S., Lin J.F., Lin Y.H., Chang H.Y. Outer membrane protein STM3031 (Ail/OmpX-like protein) plays a key role in the ceftriaxone resistance of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Agents Chemother.* 2009; 53(8): 3248–55. <https://doi.org/10.1128/AAC.00079-09>
13. Nikaïdo H., Basina M., Nguyen V.Y., Rosenberg E.Y. Multidrug efflux pump AcrAB of *Salmonella typhimurium* excretes only those β -Lactam antibiotics containing lipophilic side chains. *J. Bacteriol.* 1998; 180(17): 4686–92. <https://doi.org/10.1128/jb.180.17.4686-4692.1998>
14. Saw H.T.H., Webber M.A., Mushtaq S., Woodford N., Piddock L.J.V. Inactivation or inhibition of AcrAB-TolC increases resistance of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* to carbapenems. *J. Antimicrob. Chemother.* 2016; 71(6): 1510–9. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw028>
15. Tate H., Folster J.P., Hsu C.H., Chen J., Hoffmann M., Li C., et al. Comparative analysis of extended-spectrum- β -lactamase CTX-M-65-producing *Salmonella enterica* serovar *Infantis* isolates from humans, food animals, and retail chickens in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017; 61(7): e00488-17. <http://doi.org/10.1128/AAC.00488-17>
16. Miriagou V., Tzouveleki L.S., Rossiter S., Tzelepi E., Angulo F.J., Whichard J.M. Imipenem resistance in a *Salmonella* clinical strain due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47(4): 1297–300. <http://doi.org/10.1128/AAC.47.4.1297-1300.2003>
17. Carroll L.M., Wiedmann M., den Bakker H., Siler J., Warchocki S., Kent D., et al. Whole-genome sequencing of drug-resistant *Salmonella enterica* isolates from dairy cattle and humans in New York and Washington states reveals source and geographic associations. *Appl. Environ. Microbiol.* 2017; 83(12): e00140-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00140-17>
18. Yates C., Amyes S. Extended-spectrum β -lactamases in non-typhoidal *Salmonella* spp. isolated in the UK are now a reality: why the late arrival? *J. Antimicrob. Chemother.* 2005; 56(2): 262–4. <https://doi.org/10.1093/jac/dki237>
19. Usha G., Chunderika M., Prashini M., Willem S.A., Yusuf E.S. Characterization of extended-spectrum β -lactamases in *Salmonella* spp. at a tertiary hospital in Durban, South Africa. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 62(1): 86–91. <http://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.04.014>
20. Fischer J., Schmogger S., Jahn S., Helmuth R., Guerra B. NDM-1 carbapenemase-producing *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Corvallis* isolated from a wild bird in Germany. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013; 68(12): 2954–6. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt260>
21. Ambler R.P. The structure of β -lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 1980; 289: 321–31. <https://doi.org/10.1098/rstb.1980.0049>
22. Sun S., Selmer M., Andersson D.I. Resistance to β -lactam antibiotics conferred by point mutations in penicillin-binding proteins PBP3, PBP4 and PBP6 in *Salmonella enterica*. *PLoS One.* 2014; 9(5): e97202. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097202>
23. Vidovic S., An R., Rendahl A. Molecular and physiological characterization of fluoroquinolone-highly resistant *Salmonella enteritidis* strains. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 729. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00729>
24. Andersen J., He G.X., Kakarla P., Ranjana K.C.R., Kumar S., Lakra W.S., et al. Multidrug efflux pumps from *Enterobacteriaceae*, *Vibrio cholerae* and *Staphylococcus aureus* bacterial food pathogens. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2015; 12(2): 1487–547. <https://doi.org/10.3390/ijerph120201487>
25. Cuypers W.L., Jacob J., Wong V., Klemm E.J., Deborggraeve S., Puyvelde S.V. Fluoroquinolone resistance in *Salmonella*: insights by whole-genome sequencing. *Microb. Genom.* 2018; 4(7): e000195. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000195>
26. Magalhães M.L., Vetting M.W., Gao F., Freiburger L., Auclair K., Blanchard J.S. Kinetic and structural analysis of bi-substrate inhibition of the *Salmonella enterica* aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase. *Biochemistry.* 2008; 47(2): 579–84. <https://doi.org/10.1021/bi701957c>
27. Woegerbauer M., Zeininger J., Springer B., Hufnagl P., Indra A., Korschneck I., et al. Prevalence of the aminoglycoside phosphotransferase genes aph (3')-IIIa and aph (3')-IIa in *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* and *Staphylococcus aureus* isolates in Austria. *J. Med. Microbiol.* 2014; 63(2): 210–7. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.065789-0>
28. Wachino J.I., Arakawa Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug Resist. Updat.* 2012; 15(3): 133–48. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2012.05.001>
29. Mikheil D.M., Shippey D.C., Eakley N.M., Okwumabua O.E., Fadl A.A. Deletion of gene encoding methyltransferase (gidB) confers high-level antimicrobial resistance in *Salmonella*. *J. Antibiot.* 2012; 65(4): 185–92. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.5>
30. Roberts M.C. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol. Rev.* 1996; 19(1): 1–24. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1996.tb00251.x>
31. Nishino K., Latifi T., Groisman E.A. Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Mol. Microbiol.* 2006; 59(1): 126–41. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04940.x>
32. Chopra I., Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2001; 65(2): 232–60. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001>
33. Toro C.S., Lobos S.R., Calderon I., Rodriguez M., Mora G.C. Clinical isolate of a porinless *Salmonella typhi* resistant to high levels of chloramphenicol. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1990; 34(9): 1715–9. <https://doi.org/10.1128/AAC.34.9.1715>
34. Schwarz S., Kehrenberg C., Doublet B., Cloeckaert A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol. Rev.* 2004; 28(5): 519–42. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.04.001>
35. Khatoon A., Malik H.M.T., Aurongzeb M., Raza S.A., Karim A. Draft genome of a macrolide resistant XDR *Salmonella enterica* serovar *Paratyphi A* strain using a shotgun sequencing approach. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2019; 19: 129–31. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.09.001>

36. Island M.D., Wei B.Y., Kadner R.J. Structure and function of the *uhp* genes for the sugar phosphate transport system in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 1992; 174(9): 2754–62. <https://doi.org/10.1128/jb.174.9.2754-2762.1992>
37. Rehman M.A., Yin X., Persaud-Lachhman M.G., Diarra M.S. First detection of a fosfomycin resistance gene, fosA7, in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolated from broiler chickens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017; 61(8): e00410-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00410-17>
38. García V., Montero I., Bances M., Rodicio R., Rodicio M.R. Incidence and genetic bases of nitrofurantoin resistance in clinical isolates of two successful multidrug-resistant clones of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: pandemic “DT 104” and pUO-StVR2. *Microb. Drug Resist.* 2017; 23(4): 405–12. <https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0227>
39. Matayoshi M., Kitano T., Sasaki T., Nakamura M. Resistance phenotypes and genotypes among multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar *Choleraesuis* strains isolated between 2008 and 2012 from slaughter pigs in Okinawa Prefecture, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 2015; 77(6): 705–10. <https://doi.org/10.1292/jvms.14-0683>
40. Sun S., Negrea A., Rhen M., Andersson D.I. Genetic analysis of colistin resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53(6): 2298–305. <https://doi.org/10.1128/AAC.01016-08>
41. Lima T., Domingues S., Da Silva G.J. Plasmid-mediated colistin resistance in *Salmonella enterica*: a review. *Microorganisms.* 2019; 7(2): 55. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7020055>
42. Agerso Y., Torpdahl M., Zachariassen C., Seyfarth A., Hammerum A.M., Nielsen E.M. Tentative colistin epidemiological cut-off value for *Salmonella* spp. *Foodborne Pathog. Dis.* 2012; 9(4): 367–9. <https://doi.org/10.1089/fpd.2011.1015>
43. Ricci V., Zhang D., Teale C., Piddock L.J.V. The O-antigen epitope governs susceptibility to Colistin in *Salmonella enterica*. *mBio.* 2020; 11(1): e02831-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.02831-19>
44. Ahmer B.M.M. Cell-to-cell signalling in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* 2004; 52(4): 933–45. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04054.x>
45. McDermott P.F., Zhao S., Tate H. Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella*. *Microbiol. Spectrum.* 2018; 6(4): ARBA-0014-2017. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0014-2017>
46. Le Hello S., Hendriksen R.S., Doublet B., Fisher I., Nielsen E., Whichard J.M., et al. International spread of an epidemic population of *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198 resistant to ciprofloxacin. *J. Infect. Dis.* 2011; 204(5): 675–84. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir409>
47. Cadena M., Kelman T., Marco M.L., Pitesky M. Understanding antimicrobial resistance (AMR) profiles of *Salmonella* biofilm and planktonic bacteria challenged with disinfectants commonly used during poultry processing. *Foods.* 2019; 8(7): 275. <https://doi.org/10.3390/foods8070275>
48. Chebotar' I.V., Mayanskiy A.N., Mayanskiy N.A. Matrix of microbial biofilms. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya.* 2016; 18(1): 9–19. (in Russian)
49. von Wintersdorff C.J.H., Penders J., van Niekerk J.M., Mills N.D., Majumder S., van Alphen L.B., et al. Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Front. Microbiol.* 2016; 7: 173. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173>
50. Bertram J., Strätz M., Dürre P. Natural transfer of conjugative transposon Tn916 between gram-positive and gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 1991; 173: 443–8. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.443-448.1991>
51. Chen C.Y., Nace G.W., Solow B., Fratamico P. Complete nucleotide sequences of 84.5- and 3.2-kb plasmids in the multi-antibiotic resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium U302 strain G8430. *Plasmid.* 2007; 57: 29–43. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2006.05.005>
52. Michael G.B., Freitag C., Wendlandt S., Christopher Eidam C., Feßler A.T., Lopes G.V., et al. Emerging issues in antimicrobial resistance of bacteria from food-producing animals. *Future Microbiol.* 2015; 10(3): 427–43. <https://doi.org/10.2217/FMB.14.93>

Информация об авторах

Павлова Анастасия Сергеевна — м.н.с. лаб. молекулярной диагностики и эпидемиологии кишечных инфекций ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4619-9337>

Бочарова Юлия Александровна — к.м.н., с.н.с. лаб. молекулярной микробиологии, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0197-0255>

Кулешов Константин Валерьевич[✉] — к.б.н., с.н.с. лаб. молекулярной диагностики и эпидемиологии кишечных инфекций ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, konstantinkul@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5238-7900>

Подколзин Александр Тихонович — д.м.н., зам. директора по эпидемиологии ЦНИИ эпидемиологии, Россия, Москва, <https://orcid.org/0000-0002-0044-3341>

Чеботарь Игорь Викторович — д.м.н., зав. лаб. молекулярной микробиологии, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6691-2171>

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 03.03.2021;
принята к публикации 11.06.2021;
опубликована 20.07.2021

Information about the authors

Anastasia S. Pavlova — junior researcher, Laboratory of molecular diagnostics and epidemiology of intestinal infections, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4619-9337>

Yuliya A. Bocharova — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of molecular microbiology, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0197-0255>

Konstantin V. Kuleshov[✉] — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of molecular diagnostics and epidemiology of intestinal infections, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, konstantinkul@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5238-7900>

Aleksandr T. Podkolzin — Dr. Sci. (Med.), Deputy director, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0044-3341>

Igor V. Chebotar — Dr. Sci. (Med.), Head, Laboratory of molecular microbiology, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6691-2171>

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 03.03.2021;
accepted for publication 11.06.2021;
published 20.07.2021

Указатель статей, опубликованных в журнале в 2021 году

Оригинальные исследования

- 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., Shrivastava O., Shastri J., Srivastava S. Metabolome and exposome profiling of the biospecimens from COVID-19 patients in India **4, 397**
- Tolchkov V., Hodzhev Y., Tsafarova B., Vachiyiska E., Atanasova Yu., Baykova A., Yordanova S., Trovato A., Cirillo D., Panaiotov S. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using next generation sequencing and Mykrobe software **6, 697**
- Аджиева А.А., Данилова Т.А., Данилина Г.А., Шевлягина Н.В., Минко А.Г., Жуховицкий В.Г. Влияние антибиотиков на образование биопленки *Streptococcus pyogenes* в условиях *in vitro* **1, 59**
- Акимкин В.Г., Кузин С.Н., Колосовская Е.Н., Кудрявцева Е.Н., Семенов Т.А., Плоскирева А.А., Дубодеров Д.В., Тиванова Е.В., Пшеничная Н.Ю., Каленская А.В., Яцышина С.Б., Шипулина О.Ю., Родионова Е.Н., Петрова Н.С., Соловьева И.В., Квасова О.А., Вершинина М.А., Мамошина М.В., Клушкина В.В., Корабельникова М.И., Чурилова Н.С., Панасюк Я.В., Власенко Н.В., Остроушко А.А., Балмасов Е.С., Мосунов А.В. Характеристика эпидемиологической ситуации по COVID-19 в Санкт-Петербурге **5, 497***
- Батурин А.А., Ткаченко Г.А., Леденева М.Л., Лемасова Л.В., Бондарева О.С., Кайсаров И.Д., Шпак И.М., Бородай Н.В., Король Е.В., Тетерятникова Н.Н. Молекулярно-генетический анализ вариантов вируса Западного Нила, циркулировавших на территории европейской части России в 2010–2019 гг. **3, 308**
- Бумбали С., Серикова Е.Н., Семенов А.В., Останкова Ю.В., Валутите Д.Э., Шемелев А.Н., Зуева Е.Б., Балде Т.А.Л., Баимова Р.Р., Толоян А.А. Значимость лабораторной диагностики парентеральных вирусных гепатитов в Гвинейской Республике **4, 440***
- Бухарин О.В., Андрющенко С.В., Перунова Н.Б., Иванова Е.В. Механизм персистенции индигенных бифидобактерий под действием ацетата в кишечном биотопе человека **3, 276**
- Валутите Д.Э., Семенов А.В., Останкова Ю.В., Козлов К.В., Борисов А.Г., Назаров В.Д., Толоян А.А. Выявление мутаций лекарственной устойчивости вируса гепатита С у пациентов с неэффективной терапией препаратами прямого противовирусного действия **1, 18***
- Гапонов А.М., Волкова Н.И., Ганенко Л.А., Набока Ю.Л., Маркелова М.И., Синягина М.Н., Харченко А.М., Хуснутдинова Д.Р., Румянцев С.А., Тутельян А.В., Макаров В.В., Юдин С.М., Шестопалов А.В. Особенности микробиома толстой кишки у пациентов с ожирением при его различных фенотипах (оригинальная статья) **2, 144***
- Годовалов А.П., Карпунина Н.С., Карпунина Т.И. *Moraxella osloensis* в микробиоте репродуктивного тракта при бесплодии: случайные находки или маркеры патологии? **1, 28**
- Грачева А.В., Корчевая Е.Р., Кудряшова А.М., Борисова О.В., Петруша О.А., Смирнова Д.И., Чернышова И.Н., Свитич О.А., Зверев В.В., Файзулов Е.Б. Адаптация МТТ-теста для определения нейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2 **3, 253***
- Джайн Е.А., Плеймс Д., Глобенко А.А. Оценка мутагенности, генотоксичности и хронической токсичности имидазолитетанамида пентандиовой кислоты в тест-системах *in vitro* и *in vivo* **5, 548**
- Долгушин И.И., Генкель В.В., Батурина И.Л., Емельянов И.В., Савочкина А.Ю., Шапошник И.И. Ассоциация увеличения количества циркулирующих CD62L^{lo}CXCR4^{hi}-нейтрофилов с распространенностью каротидного атеросклероза **2, 176***
- Журавлева О.А., Воейкова Т.А., Кулигин В.С., Дебабов В.Г. Микробный синтез и оценка бактерицидных свойств наночастиц сульфида кадмия **4, 416**
- Заднова С.П., Краснов Я.М., Плеханов Н.А., Крицкий А.А., Кутырев В.В. Выявление чувствительных к полимиксину В штаммов *Vibrio cholerae* O1 серогруппы El Tor биовара и их молекулярно-генетический анализ **5, 538**
- Зайцев Е.М., Брицина М.В., Озерцовская М.Н., Мерцалова Н.У., Бажанова И.Г. Влияние антител к агглютиногенам 1 и 2, филаментозному гемагглютинирующему и коклюшному токсину на формирование биопленок *Bordetella pertussis* на абиотическом субстрате **3, 283**
- Игнатъев Г.М., Каа К.В., Антонова Л.П., Отрашевская Е.В., Ишмухаметов А.А. Иммуногенные свойства препарата, содержащего инактивированный β-пропиолактоном антиген вируса Чикунгунья **5, 519**
- Игнатъев Г.М., Ленева И.А., Отрашевская Е.В., Козловская Л.И., Карташова Н.П., Федякина И.Т., Шустова Е.Ю., Синюгина А.А., Зверев В.В., Трухин В.П., Ишмухаметов А.А. Формирование специфического иммунитета у лабораторных животных после одновременной вакцинации против сезонного гриппа и COVID-19 **6, 648***
- Ильин В.К., Бояринцев В.В., Комиссарова Д.В., Тониян К.А., Усанова Н.А., Морозова Ю.А., Муравьева В.В.,

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

- Байрамова Г.Р., Припутневич Т.В. Анализ изменения состояния влагалищной микрофлоры у женщин репродуктивного возраста в условиях трёхсуточной «сухой» иммерсии без использования средств профилактики **6, 657**
- Ильин В.К., Орлов О.И., Рыкова М.П., Комиссарова Д.В., Усанова Н.А., Антропова Е.Н., Кутько О.В., Калинин С.А., Пономарев С.А., Шеф К.А., Сахарова А.В. Состав микрофлоры и состояние системы сигнальных образ-распознающих рецепторов семейства Toll-подобных клеточных факторов врожденного иммунитета во время 120-суточной изоляции в гермо-объекте с искусственной средой обитания **1, 36**
- Катаева Л.В., Вакарина А.А., Степанова Т.Ф., Степанова К.Б. Микробиота нижних дыхательных путей при внебольничных пневмониях, в том числе ассоциированных с SARS-CoV-2 **5, 528**
- Клюева С.Н., Гончарова А.Ю., Кравцов А.Л., Бугоркова С.А. Влияние иммуномодуляции на внутриклеточную экспрессию цитокинов Т-хелперами селезёнки мышей, иммунизированных *Yersinia pestis* EV НИИ-ЭГ **2, 156**
- Ковалев Д.А., Шапаков Н.А., Писаренко С.В., Савельева И.В., Васильева О.В., Савельев В.Н., Сирица Ю.В., Жиров А.М., Ульшина Д.В., Кузнецова И.В., Бобрышева О.В., Куличенко А.Н. Генетическое типирование штаммов *Vibrio cholerae* биовара El Tor, выделенных на территории Кавказа в период 1970–1998 гг., с применением MLVA-5 и wgSNP **1, 46**
- Ковпак А.А., Ивин Ю.Ю., Пиняева А.Н., Хапчаев Ю.Х., Ожерелков С.В., Белякова А.В., Ишмухаметов А.А. Применение ультрафильтрационных мембран для очистки и концентрирования вируса полиомиелита типа 1 штамм Сэбин **2, 135**
- Лаповок И.А., Барышев П.Б., Салеева Д.В., Кириченко А.А., Шлыкова (Мурзакова) А.В., Киреев Д.Е. Применение секвенирования следующего поколения для исследования двойной ВИЧ-инфекции **6, 627***
- Медкова А.Ю., Лиджиева А.А., Сёмин Е.Г., Синяшина Л.Н., Сюндюкова Р.А., Снегирёва Н.А., Чернышова И.Н., Гаврилова М.В., Бушкова К.К., Колобухина Л.В., Кружкова И.С., Меркулова Л.Н., Русанова М.Г., Дьяков И.Н., Каратаев Г.И. Иммуногенность препарата «ГамЖВК, живая вакцина интраназального применения для профилактики коклюша» при однократном применении у здоровых добровольцев **6, 706**
- 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 **4, 434**
- Миронов К.О., Гапонова И.И., Корчагин В.И., Михайлова Ю.В., Шеленков А.А., Каптелова В.В., Чагарян А.Н., Иванчик Н.В., Козлов Р.С. Антигенная и генетическая характеристика штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от больных инвазивными и неинвазивными пневмококковыми инфекциями, с использованием высокопроизводительного секвенирования **5, 512***
- Носков А.К., Кругликов В.Д., Лопатин А.А., Чемисова О.С., Левченко Д.А., Иванова С.М., Монахова Е.В., Архангельская И.В., Водопьянов А.С., Гаевская Н.Е., Подойницына О.А., Ежова М.И. Результаты мониторинга холеры на административных территориях России в период с 2013 по 2019 год **2, 163**
- Петрова С.Ю., Хлгатян С.В., Бержец В.М., Емельянова О.Ю. Десятилетнее наблюдение за сенсibilизацией к клещам домашней пыли **2, 184**
- Погожова М.П., Гаевская Н.Е., Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Аноприенко А.О., Романова Л.В., Тюрина А.В. Биологические свойства и генетическая характеристика экспериментальных диагностических бактериофагов *Vibrio cholerae* **3, 290**
- Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Троценко О.Е., Зайцева Т.А., Лялина Л.В., Гарбуз Ю.А., Смирнов В.С., Ломоносова В.И., Балахонцева Л.А., Котова В.О., Базыкина Е.А., Бутакова Л.В., Салева Е.Ю., Алейникова Н.В., Бебенина Л.А., Лосева С.М., Каравянская Т.Н., Толоян А.А. Уровень серопревалентности к SARS-CoV-2 среди жителей Хабаровского края на фоне эпидемии COVID-19 **1, 7**
- 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 **4, 373***
- Слукин П.В., Асташкин Е.И., Асланян Е.М., Ершова М.Г., Полетаева Е.Д., Светоч Э.А., Шепелин А.П., Фурсова Н.К. Характеристика вирулентных штаммов *Escherichia coli*, выделенных от пациентов с урологической инфекцией **6, 671**
- Соломай Т.В., Семененко Т.А., Тутельян А.В., Боброва М.В. Эпидемиологические особенности инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр **6, 685***
- Тапальский Д.В., Петровская Т.А., Козлов А.Е. Формирование *in vitro* устойчивости к колистину у карбапенеморезистентных грамотрицательных бактерий и её биологическая стоимость **4, 426**
- Тимченко Н.Ф., Елисейкина М.Г., Чернодод Г.К., Грищенко О.В., Раков А.В., Щелканов М.Ю. Взаимодействие возбудителей сапронозов с клетками наземного растения воробейника краснокорневого **6, 664**
- Федотова О.С., Захарова Ю.А., Остапчук А.В., Бажанова У.А., Захаров А.А. Фенотипический профиль актуальных полирезистентных сиквенс-типов (ST 1167, ST 944, ST 208) *Acinetobacter baumannii* **6, 639**
- Фролова В.В., Чернов Н.М., Ивкин Д.Ю., Румянцев А.М., Гурина С.В. Определение возможной мишени действия 4,4а-дигидроксантонов в бактериальных клетках **5, 558**
- Царёв В.Н., Макеева И.М., Садчикова Е.Р., Подпорин М.С., Трефилова Ю.А., Арзукаян А.В., Гольдман И.Л. Методика оценки антибактериальной активности полифункционального белка трансферринового ряда при экспериментальном моделировании кинетики развития *Staphylococcus aureus* **6, 618**

Чезганова Е.А., Ефимова О.С., Сахарова В.М., Ефимова А.Р., Созинов С.А., Исмагилов З.Р., Брусина Е.Б. Дополнительный резервуар госпитальных микроорганизмов в медицинских организациях **3, 266***

Щуковская Т.Н., Гончарова А.Ю., Бугоркова С.А., Ерохин П.С., Кудрявцева О.М. Оценка действия азоксимера бромида (полиоксидония) на адгезивные свойства вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ по данным атомно-силовой микроскопии **3, 298**

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., Кулячина 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 **4, 384***

Дискуссии

Михайлов М.И., Кюрегян К.К. Современная стратегия контроля вирусного гепатита А в Российской Федерации **2, 190**

Обзоры

Gill G. Epidemiologic characteristics of *Campylobacter* infections in high-income countries: a systematic review **5, 588**

Андрюков Б.Г., Тимченко Н.Ф., Ляпун И.Н., Бынина М.П., Матосова Е.В. Гетерогенность в изогенных популяциях бактерий и современные технологии клеточного фенотипирования **1, 73**

Бавыкин А.С. Клеточный и молекулярный уровень стратегии COVID-19 по индукции иммунодефицита. Возможные терапевтические решения **4, 450**

Благодравова А.С., Жилева Т.В., Квашина Д.В. Нарушения кишечной микробиоты при расстройствах аутистического спектра: новые горизонты в поиске патогенетических подходов к терапии. Часть 2. Ось кишечник–мозг в патогенезе расстройств аутистического спектра **2, 221**

Благодравова А.С., Жилева Т.В., Квашина Д.В. Нарушения кишечной микробиоты при расстройствах аутистического спектра: новые горизонты в поиске патогенетических подходов к терапии. Часть 1. Особенности кишечной микробиоты при расстройствах аутистического спектра **1, 65**

Благодравова А.С., Жилева Т.В., Квашина Д.В. Нарушения кишечной микробиоты при расстройствах аутистического спектра: новые горизонты в поиске патогенетических подходов к терапии. Часть 3. Потенциальные стратегии влияния на ось кишечник–мозг для коррекции симптомов расстройств аутистического спектра **3, 331**

Василенко Н.Ф., Прислегина Д.А., Малецкая О.В., Таран Т.В., Платонов А.Е., Куличенко А.Н. Заболеваемость арбовирусными инфекциями на юге европейской части Российской Федерации **1, 84**

Власенко Н.В., Чурилова Н.С., Панасюк Я.В., Клушкина В.В., Дубоделов Д.В., Кудрявцева Е.Н., Семенов Т.А., Кузин С.Н., Акимкин В.Г. Однонуклеотидные полиморфизмы членов суперсемейства интерлейкина-1: ассоциация с вирусными гепатитами В и С **2, 198***

Жирнов О.П., Чернышова А.И. Фавипиравир: скрытая опасность мутагенного действия **2, 213***

Кравцов А.Л., Бугоркова С.А. Роль плазменного ингибитора сериновых лейкоцитарных протеиназ в защите организма от COVID-19 **5, 567**

Лобзин Ю.В., Кветная А.С., Скрипченко Н.В., Железова Л.И. Современные представления об этиопатогенетических и генетических особенностях токсинов *Clostridium perfringens* **1, 91**

Павлова А.С., Бочарова Ю.А., Кулешов К.В., Подколзин А.Т., Чеботарь И.В. Молекулярные детерминанты резистентности *Salmonella enterica* к антибиотикам **6, 721***

Петрова С.Ю., Хлгтян С.В., Бержец В.М., Васильева А.В. Аллергенсодержащие вакцины для специфической иммунотерапии **1, 104**

Сацук А.В., Солопова Г.Г., Плоскирева А.А. Систематический обзор вспышек гемоконтактных инфекций (гепатит В, С, ВИЧ), передающихся от пациента к пациенту при оказании медицинской помощи **3, 319***

Стовба Л.Ф., Кротков В.Т., Мельников С.А., Павельев Д.И., Черникова Н.К., Борисевич С.В. Применение штамма MVA вируса вакцины для создания рекомбинантных векторных вакцин против актуальных арбовирусных инфекций **5, 579***

Углева С.В., Шабалина С.В. Риккетсиозы в регионе Нижнего Поволжья **2, 231**

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 **4, 468**

Кужаркина В.А., Голубкова А.А., Подымова А.С. Распространённость туберкулеза у детей, перинатально экспонированных ВИЧ и ВИЧ-инфицированных, и предикторы его развития **3, 351***

Миронов К.О., Титков А.В., Кулешов К.В., Колясникова Н.М., Бондаренко Е.И., Платонов А.Е. Разработка и практическое применение методики для идентификации поверхностных антигенов *Borrelia miyamotoi* **3, 339***

Краткие сообщения

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* **4, 481**

История науки

Морозова О.М., Трошина Т.И., Морозова Е.Н., Морозов А.Н. Пандемия испанки 1918 года в России. Вопросы сто лет спустя **1, 113**

Рецензии

Малеев В.В. Рецензия на монографию «Генетические технологии» под общей редакцией академика РАН, д.м.н., проф. В.Г. Акимкина **2, 239**

Лобзин Ю.В. Рецензия на монографию «Лабораторная диагностика инфекционных болезней» под редакцией академика РАН, д.м.н., проф. В.Г. Акимкина, д.б.н., профессора М.Г. Твороговой **2, 240**

Гинцбург А.Л., Габитов А.Г., Деев С.М., Зверев В.В., Румянцев А.Г., Тахчиди Х.П., Ткачук В.А., Ющук Н.Д., Атауллаханов Р.И. Рецензия на учебник академика РАН Р.М. Хайтова «Иммунология» **5, 607**

Некрологи

Памяти Евгения Николаевича Беляева **1, 125**

Памяти Николая Николаевича Филатова **1, 127**

Памяти Светланы Сергеевны Маренниковой **2, 242**

Памяти Вячеслава Федоровича Лаврова **2, 243**

Памяти Бориса Аркадьевича Шендерова **2, 244**

Памяти Ханса-Дитера Кленка **3, 362**

Памяти Людмилы Павловны Зуевой **3, 364**

Юбилей

Белов А.Б., Кузин А.А., Зобов А.Е. Академик В.Д. Беляков — творец современной отечественной теории эпидемиологической науки: к столетию со дня рождения выдающегося учёного, педагога и военного эпидемиолога **5, 597**

К 90-летию юбилею академика РАН Дмитрия Константиновича Львова **3, 365**

Твердохлебова Т.И., Агафонова В.В. Зинаида Виссарионовна Ермольева — великий советский учёный-микробиолог и эпидемиолог **4, 486**