

5

СЕНТЯБРЬ — ОКТЯБРЬ

Том 99
2022

Ж
М
Э
И

ЖУРНАЛ
МИКРОБИОЛОГИИ
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И
ИММУНОБИОЛОГИИ

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

JOURNAL

OF MICROBIOLOGY
EPIDEMIOLOGY
AND
IMMUNOBIOLOGY

5

SEPTEMBER — OCTOBER

VOLUME 99
2022

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:

- 1.5.10. 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).

5

СЕНТЯБРЬ – ОКТЯБРЬ

**ТОМ 99
2022**

Журнал зарегистрирован
Федеральной службой по надзору
в сфере связи, информационных
технологий и массовых
коммуникаций.

Свидетельство ПИ № ФС77-75442

ISSN 0372-9311 (Print)

ISSN 2686-7613 (Online)

DOI prefix: 10.36233

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

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

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

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

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

ПОДПИСКА:

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

**Полные тексты статей журнала
доступны на сайтах:**

<https://www.microbiol.elpub.ru;>
<https://www.elibrary.ru;>
<https://www.cyberleninka.ru;>
<https://www.rucont.ru;>
[https://www.ebsco.com.](https://www.ebsco.com)

УЧРЕДИТЕЛИ:

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора
www.crie.ru

Всероссийское научно-практическое
общество эпидемиологов,
микробиологов и паразитологов

ИЗДАТЕЛЬ:

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

Начальник редакционно-

издательского отдела:

Осокина Ольга Владимировна

РЕДАКЦИЯ:

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

Заведующая редакцией:

Устинкова Ольга Владимировна

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

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

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

Подписано в печать 30.10.2022.

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@orp.bz. www.orp.bz

16+

© ФБУН ЦНИИ эпидемиологии
Роспотребнадзора, 2022

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Зверев В.В., д.б.н., проф., acad. 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., acad. РАН, директор
ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

Брико Н.И., д.м.н., проф., acad. 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., член-корр. РАН,
зав. кафедрой эпидемиологии, Кемеровский
государственный медицинский университет, Кемерово

Бухарин О.В., д.м.н., проф., acad. РАН, научный
руководитель Института клеточного и внутриклеточного
симбиоза Уральского отделения РАН, Оренбург

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

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

Жирнов О.П., д.б.н., проф., член-корр. РАН, зав. лабора-
торией вирусного патогенеза Института вирусологии
им. Д.И. Ивановского, ФНИЦ эпидемиологии и микробио-
логии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи
Минздрава России, Москва

Караулов А.В., д.м.н., проф., acad. РАН, зав. кафедрой
клинической иммунологии и аллергологии Института
клинической медицины, Первый Московский государ-
ственный 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., acad. РАН,
директор Ставропольского научно-исследовательского
противочумного института Роспотребнадзора,
Ставрополь, Россия

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

Лобзин Ю.В., д.м.н., проф., acad. 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 Voregamage, 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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Игнатьев Г.М., д.м.н., проф., зам. рук. направления каче-
ства и инновационных разработок ФГБНУ «Федеральный
научный центр исследований и разработки иммунобиоло-
гических препаратов имени М.П. Чумакова» РАН, Москва,
Россия

Кюргеня К.К., д.б.н., проф., зав. отделом изучения ви-
русных гепатитов НИИ молекулярной и персонализиро-
ванной медицины ФГБОУ ДПО «Российская медицинская
академия непрерывного профессионального образова-
ния», Москва, Россия

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

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 уни-
верситет 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., acad. РАН, советник
директора, ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора,
Москва

Михайлов М.И., д.м.н., проф., член-корр. РАН, зав. ла-
бораторией вирусных гепатитов НИИ вакцин и сывороток
им. И.И. Мечникова, Москва; проф. кафедры эпидемио-
логии Белгородского государственного университета,
Белгород

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

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

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

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., acad. РАН, директор,
Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии
и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

Черкасов С.В., д.м.н., проф., член-корр. РАН,
директор, Оренбургский федеральный исследователь-
ский центр Уральского отделения РАН, Оренбург

Шаркова В.А., д.м.н., проф., зав. кафедрой микробио-
логии 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

Мефед К.М., к.б.н., зам. генерального директора по
трансферу лекарственных средств, ООО «БиоИнтегра-
тор», группа компаний «ХИМРАР», Москва, Россия

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

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

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:

- 1.5.10. 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)

5

SEPTEMBER–OCTOBER

VOLUME 99

2022

The journal is registered by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media. Certificate of registration Pl no. FS77-75442

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

DOI prefix: 10.36233

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

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

The CrossMark service is used.

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

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

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

Index for subscription to the printed version of the journal:

United directory. Press of Russia. Newspapers and magazines: E71436, 71436.

Full texts of issues of the journal are available:

<https://www.microbiol.elpub.ru;>
<https://www.elibrary.ru;>
<https://www.cyberleninka.ru;>
<https://www.rucont.ru;>
[https://www.ebsco.com.](https://www.ebsco.com)

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 October 30, 2022. Print format 60×90¹/₈. Circulation 280 copies.

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

© Central Research Institute for Epidemiology, 2022

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

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

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 Bopemage, 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

EDITORIAL COUNCIL

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

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

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

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, Orenburg Federal Research Center, 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

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

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

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

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нагиева Ф.Г., Баркова Е.П., Строева А.Д., Аммура Ю.И., Сидоров А.В., Харченко О.С., Бахтояров Г.Н., Свитиц О.А., Зверев В.В. Биологические свойства отечественного штамма vRub-Ant вируса краснухи.....	505
Голидонова К.А., Коренберг Э.И., Гинцбург А.Л. Оптимизация мультилокусного сиквенс-анализа для лабораторной идентификации возбудителей иксодового клещевого боррелиоза*	514
Мескина Е.Р., Галкина Л.А., Целипанова Е.Е., Одинаева Н.Д. Каскад медицинской помощи детям с инфекцией, вызванной вирусом гепатита С, в Московской области*	525
Молчанова Е.В., Лучинин Д.Н., Мачнева А.Ю., Герасимова А.Д., Несговорова А.В., Бородай Н.В., Плеханова Н.Г., Батурина А.А. Компетентность комаров <i>Culex pipiens f. molestus</i> как переносчиков вируса Западного Нила при различных температурных условиях	540
Зайцев Е.М., Брицина М.В., Озерецковская М.Н., Бажанова И.Г. Влияние трипсина, лидазы и флуимуцила на рост биоплёнок <i>Bordetella pertussis</i> на абиотическом субстрате	545
Алешукина А.В., Голошва Е.В. Модифицированная питательная среда для выделения и идентификации неферментирующих бактерий.....	552
Черепович Б.С., Ртищев А.А., Аكوпова И.И., Борисова О.В., Кост В.Ю., Кутузова Н.М., Маркушин С.Г. Сравнительное изучение биологических свойств мутантов вируса гриппа А, полученных с помощью сайт-специфического мутагенеза, и варианта живой гриппозной реассортантной вакцины	557
Царев В.Н., Николаева Е.Н., Ипполитов Е.В., Царева Т.В., Подпорин М.С., Балмасова И.П. Диагностическое значение рецепторов TLR2 и TLR4 на лимфоидных клетках как маркера прогрессирования воспаления пародонта, ассоциированного с ключевыми пародонтопатогенными видами <i>F. alocis</i> и <i>P. gingivalis</i>	565
ОБЗОРЫ	
Захарова Ю.А., Иващенко И.А., Болгарова Е.В. К вопросу об актуальности разработки и перспективам использования препарата бактериофага <i>Streptococcus pneumoniae</i> *	573
Нагорных А.М., Тюменцева М.А., Тюменцев А.И., Акимкин В.Г. Анатомо-физиологические аспекты патогенеза ВИЧ-инфекции у животных моделей*	587
Маркин В.А. Вирус Марбург и вызываемое им заболевание	605

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

CONTENTS

ORIGINAL RESEARCHES

Nagieva F.G., Barkova E.P., Stroeveva A.D., Ammour Yu.I., Sidorov A.V., Kharchenko O.S., Bukhtoyarov G.N., Svitich O.A., Zverev V.V. Biological properties of domestic strain vRub-Ant of rubella virus.....	505
Golidonova K.A., Korenberg E.I., Gintsburg A.L. Optimized multilocus sequence analysis for laboratory identification of pathogens of ixodid tick-borne borreliosis*.....	514
Meskina E.R., Galkina L.A., Tselipanova E.E., Odinaeva N.D. Hepatitis C virus care cascade for children in Moscow Region*	525
Molchanova E.V., Luchinin D.N., Machneva A.Yu., Gerasimova A.D., Nesgovorova A.V., Boroday N.V., Plekhanova N.G., Baturin A.A. Competence of mosquitoes <i>Culex pipiens f. molestus</i> as carriers of West Nile virus under various temperature conditions	540
Zaytsev E.M., Britsina M.V., Ozeretskoyevskaya M.N., Bazhanova I.G. Effect of trypsin, lidase and fluimucil on the growth of <i>Bordetella pertussis</i> biofilms on an abiotic substrate	545
Aleshukina A.V., Goloshva E.V. Modified nutrient medium for isolation and identification of non-fermenting bacteria.....	552
Cherepovich B.S., Rtishchev A.A., Akopova I.I., Borisova O.V., Kost V.Y., Kutuzova N.M., Markushin S.G. Comparative study of the biological properties of influenza A virus mutants obtained by site-specific mutagenesis and the live influenza reassortant vaccine variant.....	557
Tsarev V.N., Nikolaeva E.N., Ippolitov E.V., Tsareva T.V., Podporin M.S., Balmasova I.P. Diagnostic significance of TLR2 and TLR4 receptors on lymphoid cells as a marker of the progression of periodontal inflammation associated with key periodontal pathogenic species <i>F. alocis</i> and <i>P. gingivalis</i>	565
REVIEWS	
Zakharova Yu.A., Ivashchenko I.A., Bolgarova E.V. To the question of the relevance of the development and prospects for the use of the bacteriophage <i>Streptococcus pneumoniae</i> *.....	573
Nagornykh A.M., Tyumentsev A.I., Tyumentseva M.A., Akimkin V.G. Anatomical and physiological aspects of the HIV infection pathogenesis in animal models*	587
Markin V.A. Marburg virus and the disease it causes	605

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

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-320>



Биологические свойства отечественного штамма vRub-Ant вируса краснухи

Нагиева Ф.Г.[✉], Баркова Е.П., Строева А.Д., Аммура Ю.И., Сидоров А.В., Харченко О.С., Бахтояров Г.Н., Свитич О.А., Зверев В.В.

Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

Аннотация

Введение. Краснуха — лёгкое инфекционное заболевание, поражающее преимущественно детей, вызывается вирусом краснухи (*Rubella virus* — RV), входящим в семейство *Matonoviridae*, род *Rubivirus*. Краснуха вызывает синдром врождённой краснухи (СВК) и является основной причиной аномалий развития, особенно слепоты и глухоты. Специфического лечения краснухи и СВК не существует. С целью избежать возможных осложнений от краснушной инфекции используется живая аттенуированная вакцина против краснухи на основе зарубежного штамма Wistar RA 27/3 RV. Однако актуальным, более эффективным и предпочтительным вакцинным штаммом RV для России считается вирусный штамм краснухи, циркулирующий на её территории. **Целью** исследования являлось изучение биологических свойств созданного отечественного холодоадаптированного штамма vRub-Ant, циркулирующего на территории России.

Материалы и методы. Использовали клеточные культуры — штамм диплоидных клеток лёгких эмбриона человека ЛЭЧ-3, перевиваемую клеточную линию Vero CCL-81 и Vero ECC из эмбриональных клеток почек зелёных мартышек, мезенхимальные стволовые клетки человека, мононуклеарные клетки периферической крови человека (МКПК). Клеточные культуры выращивали на питательной среде DMEM/F 12 с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки. В качестве клинического вирусного материала использовали мазки из зева и носовых ходов от ребёнка, больного краснухой. Для оценки уровня экспрессии α/β - и γ -интерфероновых рецепторов (ИФН-Р) использовали моноклональные антиидиотипические антитела, имитирующие биологические эффекты α/β - и γ -ИФН человека. В работе применяли культуральные, вирусологические, иммунохимические и серологические методы исследования.

Результаты. Аттенуацию клинического изолята pRub-Ant RV проводили на протяжении 20 последовательных пассажей на диплоидных клетках ЛЭЧ-3 при пониженной температуре 30°C. Определены основные биологические маркеры аттенуации: температурочувствительность и холодоадаптированность. Установлен более низкий уровень экспрессии α/β - и γ -ИФН-Р на мембранах МКПК человека, индуцированных вакцинным штаммом vRub-Ant в сравнении с родительским диким вариантом RV. Этот признак характерен для аттенуированных вирусных штаммов. Показано, что вакцинный штамм vRub-Ant утратил нейротропизм и не связывается с мембранными рецепторами мозга эмбрионов морских свинок, в отличие от дикого родительского варианта RV. Высокая иммуногенность отечественного холодоадаптированного штамма vRub-Ant подтверждается высокими титрами нейтрализующих краснушных антител у морских свинок, привитых подкожно одной прививочной дозой вируса.

Заключение. Создан отечественный аттенуированный вакцинный штамм vRub-Ant RV, обладающий основными биологическими маркерами аттенуации. Вакцинный штамм vRub-Ant вызывает высокий уровень нейтрализующих антител в организме морских свинок при однократной иммунизации одной прививочной дозой вакцины. Вирусный штамм vRub-Ant утратил тропизм к мембранным рецепторам мозга эмбрионов морских свинок, в отличие от своего родительского варианта.

Ключевые слова: вирус краснухи, культура клеток, холодоадаптированный отечественный штамм вируса краснухи, биологические маркеры аттенуации вируса краснухи, инфекционность образца, иммуногенность, антигенность, нейротропность, препарат мембранного рецептора мозга морских свинок

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). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом НИИВС им. И.И. Мечникова (протокол № 6 от 07.06.2021). Исследование проводилось при добровольном информированном согласии законных представителей ребенка.

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: Нагиева Ф.Г., Баркова Е.П., Строева А.Д., Аммура Ю.И., Сидоров А.В., Харченко О.С., Бахтояров Г.Н., Свитич О.А., Зверев В.В. Биологические свойства отечественного штамма vRub-Ant вируса краснухи. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2022;99(5):505–513. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-320>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-320>

Biological properties of domestic strain vRub-Ant of rubella virus

Firaya G. Nagieva[✉], Elena P. Barkova, Alexandra D. Stroeveva, Yulia I. Ammour, Alexandr V. Sidorov, Olga S. Kharchenko, Georgy N. Bukhtoyarov, Oksana A. Svitich, Vitaly V. Zverev

Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Rubella is a mild infectious disease affecting mainly children and is caused by the rubella virus, part of the *Matonaviridae* family, genus *Rubivirus*. Rubella causes congenital rubella syndrome (CRS) and is the main cause of developmental abnormalities, especially blindness and deafness.

There is no specific treatment for rubella and CRS. In order to avoid possible complications from rubella infection, a live attenuated rubella vaccine based on the foreign strain of Wistar RA 27/3 rubella virus is used. However, the actual, more effective and preferred vaccine strain the rubella virus for the Russian Federation is considered to be a viral strain of rubella circulating on its territory.

The aim of the study was to study the biological properties of the developed domestic cold-adapted strain vRub-Ant circulating in the territory of the Russian Federation.

Materials and methods. Following cell cultures were used in the study — human embryo lung diploid cell strain LECH-3, transferable cell line from embryonic kidney cells of green monkeys Vero CCL-81 and Vero ECC, human mesenchymal stem cells, human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Cell cultures were grown on a DMEM/F12 nutrient medium with the addition of 5% fetal bovine serum. Swabs from the pharynx and nasal passages from a child with rubella were used as clinical virus-containing material. Monoclonal anti-idiotypic antibodies m(anti-ID)Ab were used to assess the expression level of alpha/beta and gamma interferon receptors (α/β and γ IFN-R)Ab, imitating the biological effects of alpha/beta and gamma interferons (α/β and γ IFN) of humans. The cultural, virological, immunochemical and serological research methods were applied in the study.

Results. Attenuation of the vRub-Ant clinical isolate of rubella virus was carried out for 20 consecutive passages on LECH-3 diploid cells at a reduced temperature of 30°C. The main biological markers of attenuation were determined to be ts and ca phenotypes. The avirulence of the attenuated viral strain (att-phenotype) was assessed by the level of expression of α/β and γ IFN-R. A lower level of α/β and γ IFN-R expression was found on the membranes of human PBMC induced by the vaccine strain vRub-Ant in comparison with the parent wild variant of the rubella virus. This trait, the att phenotype, is characteristic of attenuated viral strains. It has been shown that the vaccine strain vRub-Ant has lost neurotropism and was unable to bind to the membrane receptors of the brain (MRB) of guinea pig embryos, unlike its parent rubella virus strain. The high immunogenicity of the domestic cold-adapted strain vRub-Ant was confirmed by high titers of neutralizing rubella antibodies observed in guinea pigs immunized subcutaneously with one vaccination dose of the virus.

Conclusion. A domestic attenuated vaccine strain vRub-Ant of the rubella virus that has the main biological markers of attenuation (ts-ca and att phenotypes) has been developed. The vaccine strain vRub-Ant induces a high levels of neutralizing antibodies in guinea pigs following the immunization with a single vaccination dose of the vaccine. The viral strain vRub-Ant has lost its tropism to the MRB of guinea pig embryos, unlike its parent variant.

Keywords: rubella virus, cell culture, cold-adapted domestic strain of rubella virus attenuation, infectivity of the sample, immunogenicity, antigenicity, neurotropicity, preparation of the membrane receptor of the brain of guinea pigs

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). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera (protocol No. 6, June 7, 2021). The study was conducted with the voluntary informed consent of the legal representatives of the child.

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: Nagieva F.G., Barkova E.P., Stroeveva A.D., Ammour Yu.I., Sidorov A.V., Kharchenko O.S., Bukhtoyarov G.N., Svitich O.A., Zverev V.V. Biological properties of domestic strain vRub-Ant of rubella virus. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(5):505–513. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-320>

Введение

Краснуха — это лёгкое инфекционное заболевание, которое поражает преимущественно детей и вызывается вирусом краснухи (*Rubellavirus* — RV), входящим в семейство *Matonaviridae*, род *Rubivirus* [1]. Краснуха остаётся социально-экономическим бременем из-за высокой заболеваемости синдромом врождённой краснухи (СВК). Если инфекция возникает у женщины в I триместре беременности, RV способен установить инфекцию у плода в 90% случаев в виде развития СВК. Специфического лечения краснухи и СВК не существует. В США в 1950-х гг. у 8–13% детей с СВК развился аутизм во время рубеолярной эпидемии. Считают, что СВК, вызванный в ранние сроки беременности, возникает вследствие дисфункции материнской печени, приводящей к гипервитаминозу А, который воздействует на развивающийся зародыш [2]. СВК, вызванный краснушной инфекцией, является основной причиной аномалий развития, особенно слепоты и глухоты. Системные осложнения включают сыпь при рождении, малый вес, сердечно-сосудистые дефекты, микроцефалию, психомоторное торможение, гепатит и др. Реже возникает фатальное нейродегенеративное расстройство, названное прогрессирующим краснушным панэнцефалитом. Инсулинзависимый сахарный диабет как осложнение СВК обнаруживается поздно [3–6].

Для предотвращения осложнений краснушной инфекции существует живая аттенуированная вакцина против краснухи. Большинство лицензированных вакцин против краснухи основаны на штаммах генотипа 1А, таких как Wistar RA 27/3. Другие вакцинные штаммы краснухи генотипа 1А включают штаммы Matsuura, Takahashi и TO-336, используемые главным образом в Японии [7]. Штаммы RV группируются в 2 клада и далее делятся на 13 генотипов (клада 1: 1а, 1В, 1С, 1D, 1Е, 1F, 1G, 1H, 1I и 1J; клада 2: 2А, 2В и 2С) на основе 739 нуклеотидных последовательностей в гене *E1*.

Краснушная вакцина обеспечивает защиту от инфекции RV любого генотипа, за исключением лиц с ослабленным иммунитетом.

Разработана 4-компонентная вакцина на основе отечественных штаммов вирусов кори, эпидемического паротита и ветряной оспы и зарубежного штамма RV Wistar RA 27/3 [8]. Однако более актуальным, эффективным и предпочтительным вакцинным штаммом RV для России считается вирусный штамм краснухи, циркулирующий на её территории. Кроме того, известно, что зарубежный штамм RV Wistar RA 27/3, на основе которого изготавливается краснушная вакцина, обладает побочным эффектом, заключающимся в поражении суставов. Этот эффект может встречаться у 70% привитых женщин после полового созревания. Симптомы могут варьировать по степени тяжести

от преходящей скованности суставов до артрита с болью, отёком и ограничением движения [9].

Целью исследования являлось изучение биологических свойств созданного отечественного холодоадаптированного (ха) вакцинного штамма RV vRub-Ant, циркулирующего на территории России.

Материалы и методы

При выполнении работы были использованы культуральные, вирусологические, иммунохимические и серологические методы исследования.

Культура клеток

Штамм диплоидных клеток лёгких эмбриона человека (ЛЭЧ-3) — основной клеточный субстрат для размножения и накопления штаммов RV. Для приготовления антигена RV для серологических реакций использовали Vero CCL-81 и Vero EСС — перерываемые клеточные линии почки зелёных мартышек американской и европейской коллекций клеточных культур соответственно, для приготовления антигена RV для серологических реакций — мезенхимальные стволовые клетки костного мозга человека поздних пассажей и мононуклеарные клетки периферической крови человека (МКПК).

Питательные среды

Культуры клеток выращивали в ростовой питательной среде DMEM/F12 с 5% эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС), 2 мМ глутамина, 10 мМ НЕPЕС, 40 мкг/мл гентамицина. Поддерживающей средой для репродукции вируса была среда DMEM с повышенным содержанием глюкозы и 40 мкг/мл гентамицина.

Моноклональные антиидиотипические антитела с подобными α/β - и γ -интерферону (ИФН) человека свойствами получали из мышинных лимфоцитарных гибридом.

Вирусы

Клинический материал для выделения вируса получен в 2008 г. во время эпидемической вспышки краснушной инфекции в г. Ивантеевке Московской области от здорового мальчика 7 лет, заболевшего краснухой. Законные представители ребёнка дали информированное добровольное согласие на участие в научных исследованиях. Клинический образец хранили в транспортной среде при -70°C до марта 2020 г. в виде мазков из зева, правой и левой ноздрей. Клинические образцы раздельно перенесли на монослой штамма диплоидных клеток ЛЭЧ-3 и культивировали в инкубаторе при 30°C и 5% CO_2 . На 4-е сутки культивирования на монослой клеток ЛЭЧ-3 все 3 изолята вызвали цитопатическое действие в виде цитолиза клеток. Аттенуацию клинического изолята проводили в течение 20 пассажей на штамме диплоидных клеток ЛЭЧ-3, выращенных в

культуральных флаконах с ростовой поверхностью 175 см². Пассирование клинического изолята продолжали при 30°C. Интервалы между пассажами составляли 7–9 сут.

В качестве референс-штамма RV использовали вакцинный штамм Wistar RA 27/3 RV, выделенный в 1965 г. S.A. Plotkin в США от ребёнка с СВК [10].

Оценка вирулентности вирусов

МКПК выделяли из венозной гепаринизированной (20 ЕД/мл) крови человека 0 группы, резус плюс, в градиенте плотности фиколла 1,077 г/см³ («PanEco») при центрифугировании в течение 25 мин при 1500 об/мин. Клеточную фракцию дважды промывали холодным фосфатно-буферным раствором (ФБР), осадок клеток ресуспендировали в питательной среде DMEM/F12 с 2% ЭТС с таким расчётом, чтобы в 1 мл было не менее 1 млн клеток. Лимфоциты по 1 мл распределяли в лунки 12-луночных планшетов. В лунки планшетов с лимфоцитами вносили по 0,1 мл вирусосодержащей жидкости разных пассажных уровней (3-й и 20-й пассажи) штаммов Rub-Ant. В определённые интервалы из лунок планшетов извлекали по 20 мкл суспензии лимфоцитов и наносили равномерно на предметные стекла с окнами, образцы клеток высушивали при комнатной температуре в течение ночи. Образцы фиксировали дважды фильтрованным 3% параформальдегидом с 0,2% бычьим сывороточным альбумином в течение 1 ч при комнатной температуре. Фиксатор дважды промывали ФБР, образцы слегка подсушивали и проводили блокировку 10% нормальной козлиной сывороткой в течение 1 ч. Затем на образцы наносили мышинные асцитические жидкости, содержащие моноклональные антиидиотипические антитела с «внутренним образом» α/β - и γ -ИФН, т.е. антирецепторные антитела для ИФН. После 1 ч контакта образцов с антителами во влажной камере при 37°C предметные стекла с образцами дважды промывали ФБР, слегка подсушивали и на окна с образцами наносили анти-мышинный ФИТЦ-конъюгат («Bio-Rad») в рабочем разведении на 1 ч во влажной камере при 37°C. По завершении контакта с ФИТЦ-конъюгатом предметные стекла промывали в ФБР и подсушивали.

Экспрессию α - и γ -ИФН-Р на МКПК оценивали под люминесцентным микроскопом «Optica» при увеличении 1000 по процентному соотношению светящихся лимфоцитов на 200 анализируемых клеток.

Иммуноферментный анализ

В качестве антигенов для твёрдой фазы на 96-луночные планшеты сорбировали лизаты мезенхимальных стволовых клеток, инфицированных вакцинным штаммом RV Wistar RA 27/3 или концентраты вирусосодержащей жидкости с клеток Vero-CCL-81, инфицированных вакцинным

холодоактивированным (ха) штаммом vRub-Ant RV на 20-м пассажном уровне. Остальные этапы иммуноферментного анализа (ИФА) проводили общепринятым методом. Концентрацию вирусосодержащей жидкости проводили на ультрацентрифуге ротор SW32 Ti при 25 или 26 тыс об/мин (75,0–87,5 тыс. G) в течение 6 ч.

Иммунизация морских свинок

Морским свинкам массой 300–400 г вводили подкожно в холку по 0,5 мл одну прививочную дозу вакцинных штаммов vRub-Ant и Wistar RA 27/3. Через 2 мес после иммунизации делали кардиальную пункцию. Полученные иммунные сыворотки были обработаны препаратом RDE 2 («Seiken») для удаления термолабильных и термостабильных ингибиторов для постановки реакции нейтрализации на клеточной культуре и ИФА.

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом НИИВС им. И.И. Мечникова (протокол № 6 от 07.06.2021).

Постановка перекрёстной реакции нейтрализации

Реакция нейтрализации поставлена на клеточной культуре Vero-ECS, выращенной на 24-луночных планшетах («Costar») в ростовой питательной среде. Приготовлены двукратные разведения иммунных вирусспецифических сывороток морских свинок к вакцинным штаммам vRub-Ant и Wistar RA 27/3, а также разведения моноклональных антител (МКА) к штамму Chendehill-C 74 [11] RV. В каждое разведение иммунных сывороток и МКА-C-74 в объёме 0,1 или 0,2 мл вносили равный объём 1000 доз RV, смесь вортиксировали и оставляли на контакт на 1,5 ч при 36,5°C в инкубаторе с 5% CO₂, периодически вортиксируя каждые 15 мин. В 24-луночные планшеты с выросшими клетками и с предварительно удалённой ростовой средой вносили в каждые 2 лунки по 0,1 мл разведений смеси вируса и сыворотки и вируса с МКА и оставляли на контакт на 1,5 ч в инкубаторе. После завершения контакта в лунки вносили по 0,9 или 0,8 мл поддерживающей среды. На планшете в 2 лунках ставили контроль дозы вируса и контроль клеток, культивирование продолжали в течение 7 сут. Результат реакции нейтрализации учитывали при 100% защите клеток.

Получение мембранного рецептора мозга

Иссекали мозги 5 эмбрионов морских свинок, определяли вес, ткань мозга промывали ФБР от крови, добавляли к мозговой ткани 50 мМ трис-буфера pH 7,6 и гомогенизировали в гомогене-

низаторе Даунса. Гомогенат центрифугировали при 14 000 об/мин при 4°C в настольной центрифуге. Соотношение мозговой ткани масса : объём составляло 1 : 7. Надосадоk декантировали, добавляли в него аналогичный объём буфера, и этот процесс повторяли дважды. Между 2-м и 3-м центрифугированием гомогенат инкубировали при 37°C в течение 10 мин. Конечный осадок ресуспендировали в питательной среде DMEM с 2% ЭТС, и влажный мозг хранили при -70°C до использования. Концентрация белка в эксперименте была 40 мг/мл препарата мембранного рецептора мозга (МРМ) эмбрионов морских свинок.

Определение остаточной инфекционной активности

К 100 мл вирусосодержащей жидкости дикого варианта RV pRub-Ant (3-й пассаж), вакцинного ха-штамма vRub-Ant (20-й пассаж) RV, референс-штамма RA 27/3 RV и Трис-буфера добавляли по 900 мкл нейрорецепторов мозга морских свинок. Все вышеперечисленные образцы инкубировали при 37°C в течение 30 мин с периодическим встряхиванием каждые 5 мин. Затем все образцы центрифугировали при 14 000 об/мин в течение 15 мин для удаления мембранного материала и связанного с ним вируса. Определяли остаточную вирусную инфекционность образцов в супернатанте путём титрования методом предельных разведений на чувствительных к RV клеточных культурах. Инфекционную активность оценивали по реакции гемадсорбции с 0,25% взвесью эритроцитов морских свинок.

Анализ результатов проводили с использованием статистического пакета «Prism-GfaphPad».

Результаты

На рис. 1 представлены результаты оценки феноменов температурочувствительности (ts-мутация) и холодоадаптированности (ха-мутация) аттенуированного вирусного штамма vRub-Ant на 20-м пассажном уровне в сравнении с диким родительским вариантом pRub-Ant на 2-м пассажном уровне. Аттенуированный ха-штамм не размножался при высокой температуре, в отличие от родительского дикого варианта, т.е. этот штамм обладает ts-мутацией. Репродуктивная активность аттенуированного вакцинного штамма была на 2 Ig выше при 30°C, чем при 36,5°C, что свидетельствует о ха-мутации.

В табл. 1 представлены результаты сравнительной оценки уровней экспрессии α/β - и γ -ИФН-Р на МКПК человека, индуцированных диким вариантом RV pRub-Ant (3-й пассажный уровень) и вакцинный ха-штамм vRub-Ant (20-й пассажный уровень).

Ранее нами был предложен новый биологический маркер аттенуации кандидатных вирусных штаммов [8]. В эксперименте по сравнительной оценке показателей экспрессии α/β - и γ -ИФН-Р на МКПК человека, индуцированных дикими вариантами RV и их аттенуированными вакцинными ха-штаммами, было чётко продемонстрировано, что дикие варианты родительских вирусов вызывали более высокую экспрессию α/β - и γ -ИФН-Р, чем их аттенуированные вирусные штаммы. Этот признак характеризует вирулентность (att-фенотип) диких вариантов вирусов в отличие от аттенуированных вирусных штаммов.

В табл. 1 показано, что начиная с 3 ч с момента индукции на МКПК диким вариантом pRub-Ant RV и аттенуированным ха-штаммом vRub-Ant сни-

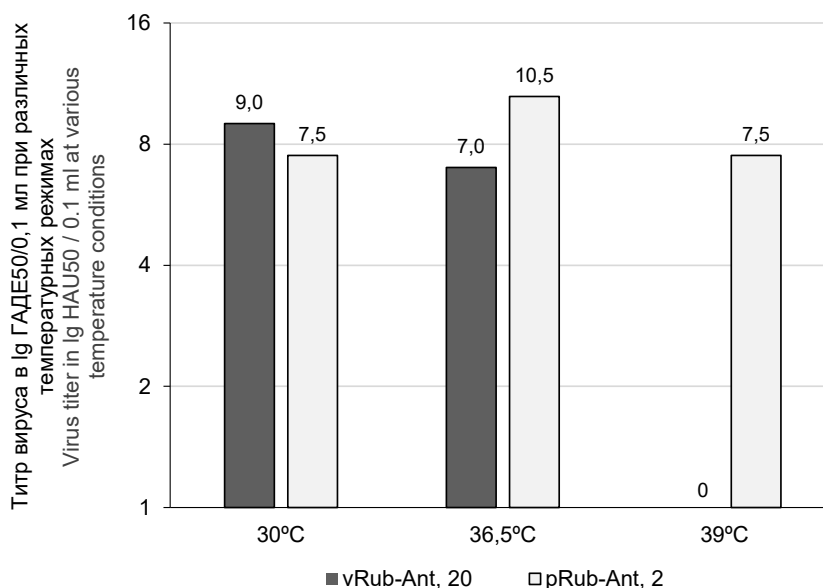


Рис. 1. Оценка маркеров биологической аттенуации (ха- и ts-фенотипы) вакцинного штамма vRub-Ant и дикого варианта RV.

Fig. 1. Evaluation of markers of biological attenuation (ca and ts phenotypes) of the «vRub-Ant» vaccine strain and the wild-type variant of RV.

Таблица 1. Уровень экспрессии α/β - и γ -ИФН-Р на МКПК человека, индуцированных различными вариантами RV
Table 1. The level of expression of α/β and γ IFN-P on human PBMC induced by various variants of the RV

Временные интервалы, ч Time intervals, hours	Уровень экспрессии α/β - и γ -ИФН-Р, % Expression level of α/β - and γ -IFN-R, %					
	α/β -ИФН-Р α/β -IFN-R		% снижения α/β -ИФН-Р % decrease of α/β -IFN-P	γ -ИФН-Р γ -IFN-R		% снижения γ -ИФН-Р % decrease of γ -IFN-P
	pRub-Ant, 3-й пассаж 3 rd passage	vRub-Ant, 20-й пассаж 20 th passage		pRub-Ant, 3-й пассаж 3 rd passage	vRub-Ant, 20-й пассаж 20 th passage	
0	0,2 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0	0,4 ± 0,02	0,5 ± 0,03	0
3	1,6 ± 0,07	1,4 ± 0,05	12,5	1,6 ± 0,07	1,2 ± 0,03	25
6	4,0 ± 0,09	2,5 ± 0,07	37,5	5,0 ± 0,04	3,0 ± 0,07	40
21	5,9 ± 0,07	4,1 ± 0,03	30,5	6,3 ± 0,06	4,1 ± 0,05	34,9
24	5,2 ± 0,05	3,25 ± 0,01	37,5	5,6 ± 0,07	3,7 ± 0,04	33,9
27	6,0 ± 0,09	3,0 ± 0,05	50	5,0 ± 0,05	2,3 ± 0,06	54
30	4,0 ± 0,03	2,3 ± 0,07	42,5	3,5 ± 0,07	2,2 ± 0,03	37,1

жается уровень экспрессии α/β - и γ -ИФН-Р аттенуированным ха-штаммом vRub-Ant. Максимальное снижение уровня экспрессии α/β - и γ -ИФН-Р аттенуированным вирусным штаммом наблюдается с 24 ч и позже с момента начала индукции.

Для оценки сравнительной иммуногенности аттенуированных штаммов RV поставлена перекрёстная реакция нейтрализации указанных штаммов RV с сыворотками морских свинок, иммунизированных подкожно одной прививочной дозой, смесью 2 МКА к штамму Chendehill (C-74) RV. Высокая иммуногенность отечественного вакцинного

ха-штамма vRub-Ant подтверждается высокими титрами иммунных сывороток морской свинки в РН со 100% защитой против 1000 доз RV штаммов vRub-Ant и штамма Wistar RA 27/3, а также МКА к штамму C-74 RV (рис. 2).

Антигенная активность сравниваемых вакцинных штаммов устанавливалась в ИФА (рис. 3). Оба вакцинных штамма обладают высокой антигенной активностью.

Специфичность связывания RV с МРМ мозга эмбрионов морских свинок определяли с помощью сравнения вирусов дикого типа и аттенуированных

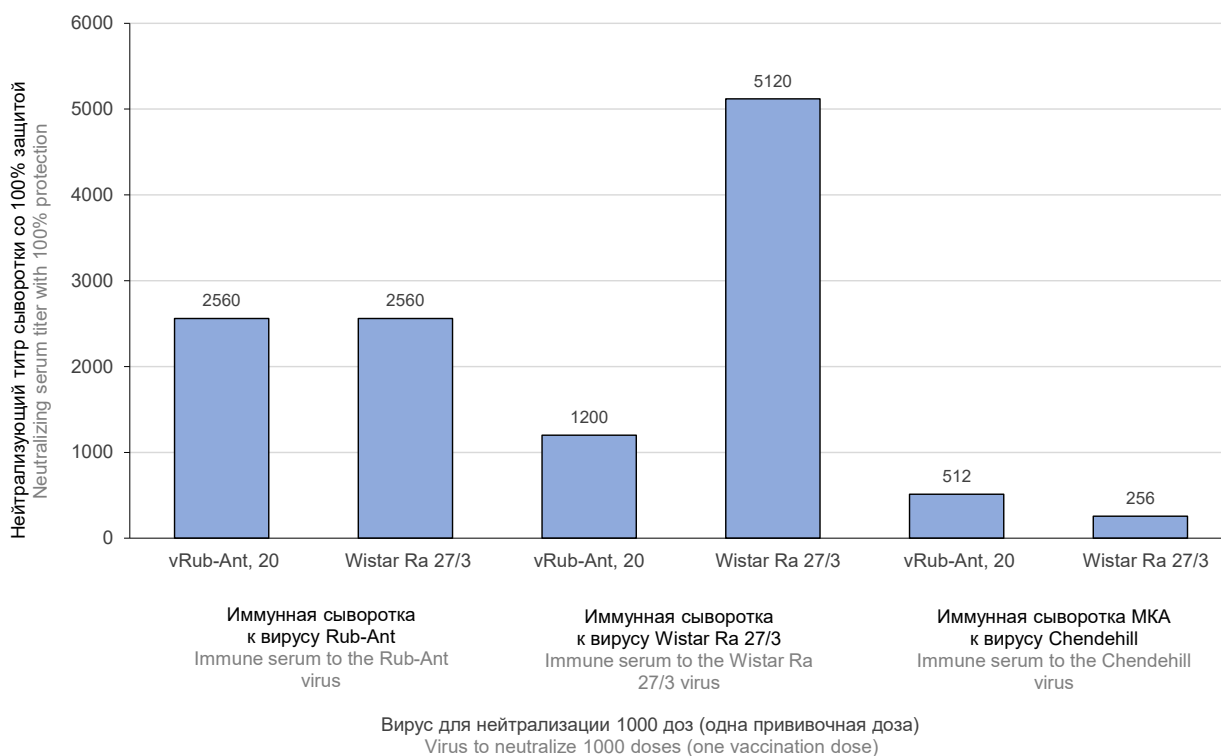


Рис. 2. Перекрёстная реакция нейтрализации аттенуированных штаммов RV.

Fig. 2. Cross-neutralization reactivity of attenuated strains of RV.

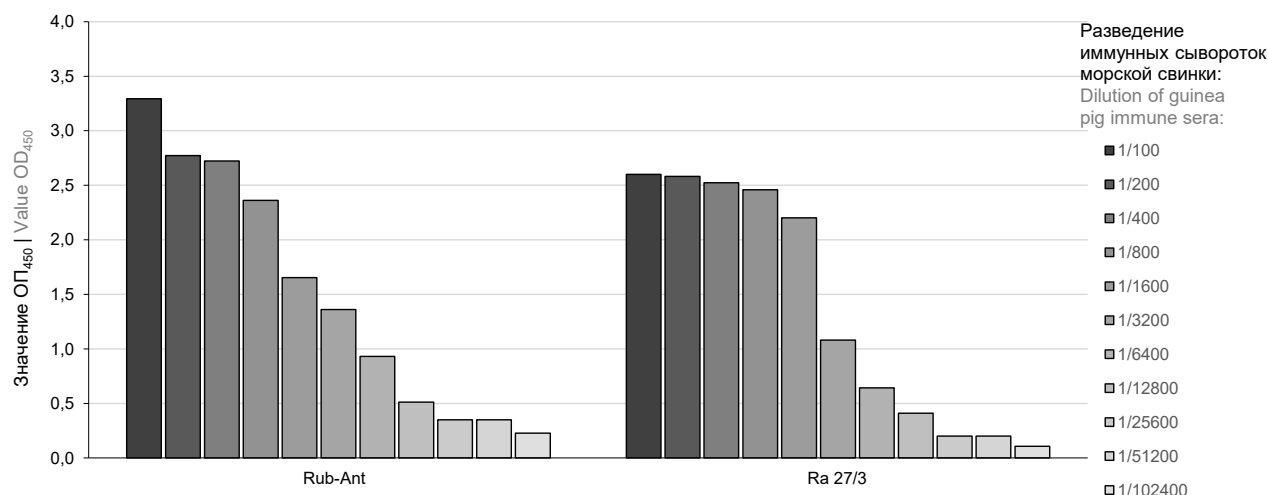


Рис. 3. Значения оптической плотности при длине волны 450 нм (OP_{450}) специфических сывороток морских свинок на 60-е сутки после иммунизации штаммами vRub-Ant и Wistar RA 27/3 RV.

Fig. 3. Diagram of OP_{450} values of specific guinea pig sera on the 60th day after immunization with vRub-Ant and Wistar RA 27/3 strains of RV.

Таблица 2. Сравнительная оценка связывания штаммов вируса краснухи с препаратами МРВ эмбрионов морских свинок

Table 2. Comparative evaluation of binding of rubella virus strains with MRM preparations of guinea pig embryos

Вирусный штамм Viral strain	Инфекционность, Ig ГАДЕ _{50/0,1 мл} Infectivity, Ig HAU _{50/0,1 ml}		<i>p</i>	Индекс связывания, Ig ГАДЕ _{50/0,1 мл} The binding index, Ig HAU _{50/0,1 ml}	Связывание, % Binding, %
	RV + буфер RV + buffer (<i>n</i> = 5)	RV + МРМ RV + MRM (<i>n</i> = 5)			
vRub-Ant	8,5 ± 0,08	8,5 ± 0,1	< 0,001	0	0
pRub-Ant	9,5 ± 0,1	8,5 ± 0,09	< 0,001	1,0	10,5
Wistar RA 27/3	6,5 ± 0,08	6,5 ± 0,06	< 0,001	0	0
Контроль (трис-буфер) Control (Tris buffer)	0	0		0	0

вакцинных вирусных штаммов [12]. При сравнении ха-штамма vRub-Ant вируса краснухи на 20-м пассажном уровне с его диким родительским вариантом на 3-м пассажном уровне выявлено, что дикий вариант связывается с препаратом нейрорецепторов мозга эмбрионов морской свинки с индексом связывания 1,0 Ig ГАДЕ_{50/0,1 мл}, процент связывания составляет 10,5, в то время как вакцинный ха-штамм vRub-Ant полностью утратил тропизм к нервной ткани (табл. 2). Такая же картина наблюдается и со сравнимым зарубежным вакцинным штаммом RV Wistar RA 27/3.

Обсуждение

В НИИВС им. И.И. Мечникова создана 4-компонентная живая культуральная вакцина vRub-Ant на основе 3 отечественных вакцинных штаммов вируса кори, эпидемического паротита и ветряной оспы [13, 14] и зарубежного вакцинного штамма Wistar RA 27/3 RV. Вакцинный штамм RV получен в США S.A. Plotkin от ребёнка с СВК [10].

Целью нашего исследования являлось создать отечественный вакцинный штамм RV, циркулирующий на территории России. Основными биологическими маркерами аттенуации являются температурочувствительность и холодоадаптированность вируса. Вакцинный штамм vRub-Ant обладает ts- и ха-фенотипами.

Как правило, вирулентность вирусов оценивается на животной модели. Однако для RV такой модели для оценки вирулентности вирусного штамма не существует, кроме обезьян.

Ранее нами на мембранах МКПК человека установлено, что уровень экспрессии α/β - и γ -ИФН-Р дикого варианта RV выше, чем аттенуированного штамма vRub-Ant, т.е. вирулентность вакцинного штамма значительно ослаблена.

Основным свойством вакцины является её иммуногенность. Вирус-специфические сыворотки морских свинок в реакции нейтрализации с 1000 дозой гомологичных и гетерологичных RV показали высокие титры при 100% защите чувствитель-

ной клеточной культуры.

Другим важным свойством вакцинных штаммов является отсутствие нейротропности. Мы сравнили нейротропность вакцинного штамма vRub-Ant и дикого родительского варианта rRub-Ant с использованием МРМ эмбрионов морских свинок и установили, что родительский вариант RV связывается с МРМ эмбрионов морских свинок, а вакцинный ха-штамм утратил эту способность.

Заклучение

Создан отечественный вакцинный штамм RV vRub-Ant, обладающий основными биологическими маркерами аттенуации. Вакцинный штамм RV vRub-Ant вызывает высокий уровень нейтрализующих антител в организме морских свинок при однократной иммунизации прививочной дозой. В процессе холодовой адаптации на диплоидных клетках лёгких эмбриона человека показано, что вакцинный штамм RV vRub-Ant утратил тропизм к рецепторам мозга эмбрионов морских свинок в отличие от своего родительского дикого варианта. Детально охарактеризованный отечественный вакцинный штамм vRub-Ant может быть использован при изготовлении краснушной моновакцины и включён в качестве компонента в тривакцину (корь, эпидемический паротит, краснуха) и в тетравакцину (корь, эпидемический паротит, краснуха и ветряная оспа).

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Gershon A.A. Rubella virus (German Meales). In: *Mandell, Douglas, and Bennet's Principles and Practice. Volume 2*. Elsevier; 2015: 1875–80. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00154-5>
- Mawson A.R., Croft A.M. Rubella virus infection, the congenital rubella syndrome, and link to autism. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2019; 16(19): 3543–71. <https://doi.org/10.3390/ijerph16193543>
- Banatvala J.E., Brown D.W.G. Rubella. *Lancet*. 2004; 363(9415): 1127–37. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)15897-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15897-2)
- George S.R., Viswanathan R., Sarkal G.N. Molecular aspects of the teratogenesis of rubella virus. *Biol. Res*. 2019; 52(1): 47. <https://doi.org/10.1186/s40659-019-0254-3>
- Lambert N., Strebel P., Orenstein W., Icenogle J., Poland G.A. Rubella. *Lancet*. 2015; 385(9984): 2297–307. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60539-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60539-0)
- Lee J.Y., Bowden D.S. Rubella virus replication and links to teratogenicity. *Clin. Microbiol. Rev*. 2000; 13(4): 571–87. <https://doi.org/10.1128/cmr.13.4.571-587.2000>
- Shishido A., Ohtawara V. Development of attenuated rubella virus vaccines in Japan. *Jpn J. Med. Sci. Biol*. 1976; 29(5): 227–53. <https://doi.org/10.7883/yoken.952.29/227>
- Нагиева Ф.Г., Баркова Е.П., Строева А.Д., Сидоров А.В., Лотте В.Д., Зверев В.В. Характеристика связывания вакцинных штаммов вируса *Varicella zoster* с препаратами мембранных рецепторов мозга мышей. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2020; 97(2): 125–33. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-125-133>
- Best L.M., Banatvala J.E. Congenital virus infections. *BMJ*. 1990; 300(6733): 1151–2. <https://doi.org/10.1136/bmj.300.6733.1151>
- Plotkin S.A. The history of rubella and rubella vaccination

leading to elimination. *Clin. Infect. Dis*. 2006; 43(Suppl. 3): S164–68. <https://doi.org/10.1086/505950>

- Нагиева Ф.Г., Никулина В.Г., Баркова Е.П., Зубков А.В., Кузьмина Н.С., Десяткова Р.Г. и др. Моноклональные антитела к гликопротеину E1 вируса краснухи. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2011; 88(1): 61–7.
- Barrett F., Ryman K., Ni H. Method of attenuating viruses. Patent US EPO922092B1; 1999.
- Осокина О.В., Баркова Е.П., Нагиева Ф.Г., Зверев В.В. Штамм "vfiravax" для получения аттенуированной живой культуральной вакцины для профилактики ветряной оспы. Патент РФ № 2693440; 2019.
- Зверев В.В., Нагиева Ф.Г., Баркова Е.П., Осокина О.В. Способ получения четырехкомпонентной культуральной живой вакцины против кори, ветряной оспы, эпидемического паротита, краснухи. Патент РФ №2693440; 2019.
- Нагиева Ф.Г., Баркова Е.П., Строева А.Д., Сидоров А.В., Зверев В.В. Характеристика маркеров холодовой адаптации кандидатных вакцинных штаммов для живых аттенуированных вакцин против ветряной оспы и опоясывающего герпеса. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2020; 97(4): 303–11. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-2>

REFERENCES

- Gershon A.A. Rubella virus (German Meales). In: *Mandell, Douglas, and Bennet's Principles and Practice. Volume 2*. Elsevier; 2015: 1875–80. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00154-5>
- Mawson A.R., Croft A.M. Rubella virus infection, the congenital rubella syndrome, and link to autism. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2019; 16(19): 3543–71. <https://doi.org/10.3390/ijerph16193543>
- Banatvala J.E., Brown D.W.G. Rubella. *Lancet*. 2004; 363(9415): 1127–37. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)15897-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15897-2)
- George S.R., Viswanathan R., Sarkal G.N. Molecular aspects of the teratogenesis of rubella virus. *Biol. Res*. 2019; 52(1): 47. <https://doi.org/10.1186/s40659-019-0254-3>
- Lambert N., Strebel P., Orenstein W., Icenogle J., Poland G.A. Rubella. *Lancet*. 2015; 385(9984): 2297–307. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60539-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60539-0)
- Lee J.Y., Bowden D.S. Rubella virus replication and links to teratogenicity. *Clin. Microbiol. Rev*. 2000; 13(4): 571–87. <https://doi.org/10.1128/cmr.13.4.571-587.2000>
- Shishido A., Ohtawara V. Development of attenuated rubella virus vaccines in Japan. *Jpn J. Med. Sci. Biol*. 1976; 29(5): 227–53. <https://doi.org/10.7883/yoken.952.29/227>
- Nagieva F.G., Barkova E.P., Stroeveva A.D., Sidorov A.V., Lotte V.D., Zverev V.V., et al. Characterization of binding of *Varicella zoster* virus vaccine strains to preparations of mouse brain membrane receptors. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(2): 125–33. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-125-133> (in Russian)
- Best L.M., Banatvala J.E. Congenital virus infections. *BMJ*. 1990; 300(6733): 1151–2. <https://doi.org/10.1136/bmj.300.6733.1151>
- Plotkin S.A. The history of rubella and rubella vaccination leading to elimination. *Clin. Infect. Dis*. 2006; 43(Suppl. 3): S164–68. <https://doi.org/10.1086/505950>
- Nagieva F.G., Nikulina V.G., Barkova E.P., Zubkov A.V., Kuz'mina N.S., Desyatkov R.G., et al. Monoclonal antibodies to rubella virus glycoprotein E1. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2011; 88(1): 61–7. (in Russian)
- Barrett F., Ryman K., Ni H. Method of attenuating viruses. Patent US EPO922092B1; 1999.
- Osokina O.V., Barkova E.P., Nagieva F.G., Zverev V.V. The vFiraVax strain for producing an attenuated live culture vaccine

- for the prevention of chickenpox. Patent RF № 2693440; 2019. (in Russian)
14. Zverev V.V., Nagieva F.G., Barkova E.P., Osokina O.V. Method of obtaining a four-component cultured live vaccine against measles, chickenpox, mumps, rubella (NT). Patent RF 2693440; 2019. (in Russian)
15. Nagieva F.G., Barkova E.P., Stroeveva A.D., Sidorov A.V., Zverev V.V. Characterization of markers of cold-adapted can-

didate virus strains for live attenuated vaccines against chickenpox and shingles. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(4): 303–11. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-2> (in Russian)

Информация об авторах

Нгиева Фирая Галиевна[✉] — д.м.н., доцент, зав. лаб. гибридных клеточных культур отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, fgn42@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8204-4899>

Баркова Елена Петровна — к.б.н., в.н.с. лаб. гибридных клеточных культур отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3369-8869>

Строева Александра Дмитриевна — м.н.с. лаб. гибридных клеточных культур отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4179-931X>

Аммур Юлия Игоревна — к.б.н., зав. лаб. экспериментальной иммунологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0223-5738>

Сидоров Александр Викторович — к.б.н., зав. лаб. генетики ДНК-содержащих вирусов отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3561-8295>

Харченко Ольга Сергеевна — н.с. лаб. ДНК-содержащих вирусов отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2169-9610>

Бахтяров Георгий Николаевич — к.б.н., н.с. лаб. генетики ДНК-содержащих вирусов отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2169-9610>

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

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

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 30.07.2022;
принята к публикации 11.10.2022;
опубликована 30.10.2022

Information about the authors:

Firaya G. Nagieva[✉] — D. Sci. (Med.), Associate Professor, Head, Laboratory of hybrid cell cultures, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, fgn42@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8204-4899>

Elena P. Barkova — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of hybrid cell cultures, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3369-8869>

Alexandra D. Stroeveva — junior researcher, Laboratory of hybrid cell cultures, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4179-931X>

Yulia I. Ammur — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of experimental immunology, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0223-5738>

Alexander V. Sidorov — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of genetics of DNA-containing viruses, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3561-8295>

Olga S. Kharchenko — researcher, Laboratory of DNA viruses, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2169-9610>

Georgy N. Bukhtoyarov — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Laboratory of genetics of DNA-containing viruses, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2169-9610>

Oksana A. Svitich — D. Sci. (Med.), Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Director, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>

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

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 30.07.2022;
accepted for publication 11.10.2022;
published 30.10.2022

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-296>

Оптимизация мультилокусного сиквенс-анализа для лабораторной идентификации возбудителей иксодового клещевого боррелиоза

Голидонова К.А.[✉], Коренберг Э.И., Гинцбург А.Л.

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

Аннотация

Введение. Наиболее широко распространённые этиологические агенты иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ) в России — *Borrelia garinii*, *B. afzelii*, *B. bavariensis*. Для определения видовой принадлежности боррелий в современных исследованиях используют методы мультилокусного сиквенс-типирования и сиквенс-анализа (МЛСА). Ранее были продемонстрированы результаты применения схемы МЛСА для идентификации возбудителей эритемных форм ИКБ.

Цель работы — изучить возможность оптимизации МЛСА для практической лабораторной идентификации возбудителей ИКБ. **Задачи:** сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей локусов 6 консервативных генов (*rrs*, *hbb*, *fla*, *groEL*, *recA*, *ospA*) и межгенного спейсера *rrfA-rrlB*, рекомендованных протоколом МЛСА; выявление минимальной совокупности генов, сцепленные сиквенсы которых позволяют идентифицировать видовую принадлежность изолята боррелий.

Материалы и методы. Сиквенсы вышепредставленных локусов 23 «контрольных» изолятов, полученных от больных ИКБ и предварительно типированных методом МЛСА как *B. bavariensis*, использованы для сравнительного анализа с последовательностями аналогичных генов других видов боррелий, имеющимися в международных базах данных. На основе этого материала методом UPGMA построена и проанализирована серия дендрограмм.

Результаты. Сиквенсы локусов гена *ospA* контрольного вида показали наибольшее отличие (не менее 8,5%) от последовательностей этого гена у других сравниваемых видов боррелий; близкие показатели видовых отличий (не менее 6,7%) продемонстрировало сравнение сиквенсов гена *recA*. Сиквенсы выявленных вариантов двух этих генов у *B. bavariensis* отличались от последовательностей аналогичных генов у наиболее близкого вида — *B. garinii*. Дендрограмма сцепленных нуклеотидных последовательностей генов *recA* и *ospA* продемонстрировала её идентичность результатам идентификации изолятов по полному протоколу МЛСА.

Заключение. Предложен оптимизированный подход к МЛСА боррелий группы *B. burgdorferi sensu lato*, который сводится к выявлению их видовой принадлежности на основании специфики результата сцепленного анализа локусов только двух генов (*recA* и *ospA*) из 7 локусов, рекомендованных протоколом этого метода.

Ключевые слова: иксодовые клещевые боррелиозы, МЛСА, идентификация возбудителя, лабораторная диагностика

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи (протокол № 18 от 21.02.2022).

Благодарность. Авторы выражают признательность институту и коллегам лаборатории, оказывавшим консультацию, поддержку и помощь в работе.

Источник финансирования. Исследование финансировалось за счёт средств, полученных для выполнения Государственного задания лаборатории.

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

Для цитирования: Голидонова К.А., Коренберг Э.И., Гинцбург А.Л. Оптимизация мультилокусного сиквенс-анализа для лабораторной идентификации возбудителей иксодового клещевого боррелиоза. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(5):514–524.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-296>

Optimized multilocus sequence analysis for laboratory identification of pathogens of ixodid tick-borne borreliosis

Kristina A. Golidonova[✉], Edward I. Korenberg, Alexander L. Gintsburg

National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. The most common etiological agents of ixodid tick-borne borreliosis (ITBB) in Russia are *Borrelia garinii*, *B. afzelii*, *B. bavariensis*. Multilocus sequence typing and multilocus sequence analysis (MLSA) have been used in recent studies for *Borrelia* species identification. The results of using the MLSA scheme for identification of pathogens causing erythemic forms of ITBB have been presented earlier.

The **purpose** of the study was to explore the possibility of MLSA optimization for laboratory identification of ITBB pathogens. Objectives: comparative analysis of nucleotide sequences of 6 conserved genes (*rrs*, *hbb*, *fla*, *groEL*, *recA*, *ospA*) and the *rrfA-rrlB* intergenic spacer, which are recommended by the MLSA protocol; identification of the minimum set of genes, the concatenated sequences of which are essential for species identification of *Borrelia* isolates.

Materials and methods. The sequences of the above loci of 23 reference isolates collected from patients with ITBB and assigned, using MLSA, to *B. bavariensis* were compared with the sequences of similar genes of other *Borrelia* species available in international databases. The UPGMA method was used to build and analyze dendrograms based on the obtained data.

Results. The sequences of *ospA* gene loci of reference species demonstrated the greatest difference (not less than 8.5%) from the sequences of the above gene in other analyzed species of *Borrelia*; approximately similar species-related differences (not less than 6.7%) were demonstrated by the comparison of *recA* gene sequences. The sequences of the identified variants of these two genes in *B. bavariensis* differed from the sequences of the similar genes in the most closely related species — *B. garinii*. The dendrogram of the concatenated nucleotide sequences of *recA* and *ospA* genes demonstrated that it was totally consistent with the results of identification of the isolates based on the MLSA protocol.

Conclusion. The optimized approach to MLSA of the *B. burgdorferi* sensu lato group suggests that species identification should be based on the concatenated analysis of loci of only two genes (*recA* and *ospA*) out of 7 loci recommended by the MLSA protocol.

Keywords: ixodid tick-borne borreliosis, MLSA, identification of a pathogen, laboratory diagnostics

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya (protocol No. 18, February 21, 2022).

Acknowledgement. The authors extend their gratitude to their Institute and laboratory associates who provided consulting, support, and assistance in their work.

Funding source. The study was supported by funds received for the Federal Task commissioned to the laboratory.

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

For citation: Golidonova K.A., Korenberg E.I., Gintsburg A.L. Optimized multilocus sequence analysis for laboratory identification of pathogens of ixodid tick-borne borreliosis. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology* = *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(5):514–524.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-296>

Введение

Иксодовые клещевые боррелиозы (ИКБ) — группа этиологически самостоятельных хронических или рецидивирующих спирохетозных природно-очаговых трансмиссивных инфекций, способных поражать различные системы и органы. Природные очаги ИКБ распространены в России в основном в лесной зоне. По уровню заболеваемости боррелиозы занимают одно из ведущих мест среди природно-очаговых зоонозов [1, 2].

Возбудители ИКБ — спирохеты комплекса *Borrelia burgdorferi* sensu lato, включающего более

20 видов [3], 8 из которых обнаружены в России [4]. Наиболее широко распространённые этиологические агенты ИКБ в нашей стране и большей части Евразии — *B. garinii*, *B. afzelii* и *B. bavariensis* [1, 5]. *B. garinii* чаще вызывает среднетяжёлую форму заболевания с общим инфекционным синдромом, при этом около 60% случаев составляет эритемная форма. Инфекционный процесс, вызванный *B. afzelii*, чаще протекает в лёгкой форме и обычно сопровождается развитием мигрирующей эритемы на месте укуса клеща [6, 7]. Эритемную форму ИКБ с различным спектром клинических проявлений

вызывает и *B. bavariensis* [5]. Следовательно, мигрирующая эритема, которую клиницисты считают единственным патогномичным признаком ИКБ, с большей или меньшей частотой может возникать при любом из наиболее распространённых этиологических агентов заболеваний этой группы.

Даже при наличии у пациента эритемы, степень выраженности и величина которой могут зависеть от ряда причин, включая сходные кожные проявления иной этиологии, клинический диагноз ИКБ в большинстве случаев нуждается в лабораторном подтверждении. С этой целью в настоящее время обычно применяют различные серологические методы: реакцию непрямой иммунофлюоресценции, иммуноферментный анализ, иммуноблоттинг, варианты мультиплексного анализа (включая фосфоресцентный) и др. Эти методы характеризуются различными показателями специфичности и чувствительности, варьирующими в разные сроки от начала заболевания ИКБ. Они, как правило, наименее эффективны в его первые недели и совершенно безрезультативны в нередких серонегативных случаях. Возможность прямой изоляции возбудителя путём посевов проб на питательную среду сильно ограничена непродолжительностью боррелиемии, а также необязательностью его присутствия (особенно в остром периоде инфекционного процесса) в том или ином органе, тканях и биологических жидкостях пациента. Кроме того, посевы биоматериала не могут быть массовым лабораторно-диагностическим тестом ИКБ из-за продолжительности роста боррелий в положительных пробах. Однако из различных материалов, полученных от пациентов, можно амплифицировать ДНК боррелий методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Её клиническая чувствительность при исследовании ликвора пациентов не превышает 20%, при анализе плазмы крови — варьирует от 30 до 50%, при тестировании синовиальной жидкости может превышать 70%, а биоптатов кожи — 80% [1, 8].

Для определения видовой принадлежности боррелий в современных исследованиях широко используют методы мультилокусного сиквенса-типирования (МЛСТ) [9] и сиквенса-анализа (МЛСА) [1], основанные на выявлении специфики нуклеотидных последовательностей консервативных генов [10]. Применительно к видовой идентификации этиологии ИКБ каждый из этих методов имеет определённые особенности. Так, оба метода основаны на анализе нуклеотидных последовательностей локусов 7–8 разных консервативных генов (включая межгенный спейсер *rrfA-rrlB*), которые рекомендовано использовать при построении итоговых дендрограмм по сцепленным данным. При МЛСТ для построения дендрограмм используют матрицу несовпадений в аллельном профиле, игнорируя количество нуклеотидных различий между аллелями, которым

присваивают разные номера независимо от того, различаются ли нуклеотидные последовательности в одном сайте или во многих сайтах [10]. Этот метод давно и успешно используют при видовой идентификации различных групп патогенных бактерий, а для некоторых из них его считают «золотым стандартом» [11–13]. При МЛСА, наоборот, для определения филогенетических отношений тестируемых образцов используют сцепленные последовательности фрагментов их генов домашнего хозяйства [4, 10]. Схемой МЛСТ в зависимости от источника и концентрации ДНК рекомендовано проводить одноили двухраундовую ПЦР и амплифицировать более длинные фрагменты консервативных генов [14], а схема МЛСА рекомендует однораундовую ПЦР менее длинных локусов [10, 15]. Поэтому для видовой идентификации значительного числа изолятов боррелий МЛСА во всех отношениях менее затратен, чем МЛСТ. Подробнее преимущества и недостатки этих методов рассмотрены нами ранее [16].

Результаты применения схемы МЛСА для идентификации этиологического агента эритемных форм ИКБ продемонстрированы нами на клиническом материале (более 20 изолятов, полученных из биоптатов кожи и плазмы крови пациентов). Было установлено, что все изоляты относятся к *B. bavariensis*, выявлена вариабельность нуклеотидных последовательностей локусов анализируемых консервативных генов [5]. Это определило **цель** нашего исследования: изучить возможность оптимизации МЛСА для практической лабораторной идентификации возбудителей ИКБ.

Поставлены следующие задачи: сравнительный количественный анализ внутривидовой гетерогенности нуклеотидных последовательностей локусов 6 консервативных хромосомных генов (*rrs*, *hbb*, *fla*, *groEL*, *recA*, *ospA*) и межгенного спейсера (*rrfA-rrlB*), рекомендованных для МЛСА; выявление минимальной совокупности генов, сцепленных нуклеотидные последовательности которых позволяют идентифицировать видовую принадлежность изолята боррелий группы *B. burgdorferi sensu lato*.

Материалы и методы

У 23 изолятов, хранящихся в музейной коллекции боррелий лаборатории переносчиков инфекций ФГБУ НИЦЭМ имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи, исследованы нуклеотидные последовательности локусов каждого из 6 генов (перечислены выше) и спейсера *rrfA-rrlB*, рекомендованных для МЛСА [15]. Изоляты получены от больных людей путём посева на среду BSK кожных биоптатов из периферической части эритем (17 изолятов) или из плазмы крови (6 изолятов) пациентов Краевой инфекционной больницы г. Пермь (восток Восточной Европы;

58°00' с.ш.; 56°15' в.д.) с локализованной стадией манифестной формы ИКБ с мигрующей эритемой. Количество исследованных изолятов составляет не менее 30–40% среднего числа всех пациентов с ИКБ, ежегодно поступающих в этот клинический стационар [6]. Культивирование и типирование изолятов методом ПЦР-полиморфизма длин рестрикционных фрагментов спейсерного участка *rrfA-rrlB* позволило ранее отнести их к *B. garinii* NT29 [17, 18]. По результатам наших исследований методом МЛСА эти изоляты идентифицированы как *B. bavariensis*. Нуклеотидные последовательности использованных праймеров, режим ПЦР и условия последующего секвенирования ампликонов описаны ранее [5, 15, 19].

Все полученные нуклеотидные последовательности сравнивали между собой (с использованием платформы BLAST) и с нуклеотидными последовательностями локусов аналогичных генов у типовых или референсных штаммов других видов спирохет *B. burgdorferi sensu lato*, представленными в базах данных GenBank INSDC и PubMLST *Borrelia* spp. Для этого методом невзвешенного парного среднего (UPGMA) была построена серия дендрограмм с использованием пакета программ «MEGA-X v. 10.2.4» при величине bootstrap 1000 повторов. Значительная часть этих дендрограмм проанализирована ранее [5, 19]. В данной статье приведены лишь те, которые необходимы для обоснования заключения данной статьи и ранее не публиковались.

Нуклеотидные последовательности 10 локусов исследованных генов депонированы в базу данных Genbank (номера доступа MW981426, MZ005315-

MZ005321, OM310938–OM310939) и 4 более коротких сиквенса — в базу данных European Nucleotide Archive (номера доступа OD916881–OD916884).

Результаты

Сравнительный анализ данных нуклеотидных последовательностей локусов генов, рекомендованных для МЛСА

В табл. 1 представлены показатели сходства нуклеотидных последовательностей локусов каждого гена у всех изученных нами изолятов, идентифицированных по результатам МЛСА как *B. bavariensis*, включая опубликованные ранее данные по генам *rrs*, *fla*, *hbb* и *recA* [5, 19]. Сходство оказалось значительным (до 99,5–100%) у изолятов из кожных биоптатов и из плазмы крови пациентов. С локусами других генов минимальное сходство (95,3%) имели некоторые последовательности гена *ospA*. Однако сиквенсы этого гена на 9,5–10,9% отличались от сиквенсов того же гена *B. garinii* 20047T (наиболее близкий вид по общей структуре генома [20]), а также на 8,5% (т.е. больше, чем у всех других генов) от совокупности сиквенсов широко распространённых боррелий группы *B. burgdorferi sensu lato*. Аналогичные показатели для сиквенсов гена *recA* оказались несколько меньше, чем у гена *ospA*, но больше, чем у остальных исследованных генов (табл. 1). Отличия нуклеотидных последовательностей секвенированных нами локусов двух этих генов от последовательности аналогичного участка генома референсного штамма РВи европейской подгруппы *B. bavariensis* были существенными (до 8,1%). Эти результаты стиму-

Таблица 1. Вариабельность нуклеотидных последовательностей совокупности локусов (по результатам 23 исследованных изолятов *B. bavariensis*) каждого гена

Table 1. Variability of the nucleotide sequences of the set of loci (according to the results of 23 studied isolates of *B. bavariensis*) of each gene

Ген (мишень) Gene (target)	Сходство нуклеотидных последовательностей между изолятами из кожных биоптатов и из плазмы, % Nucleotide sequence similarity between skin biopsy and plasma isolates, %	Отличие от (в %) Difference from (in %)		
		<i>B. bavariensis</i> РВи	<i>B. garinii</i> 20047T	других видов боррелий <i>B. burgdorferi</i> s. l, не менее other <i>Borrelia</i> species <i>B. burgdorferi</i> s. l, not less than
<i>rrs</i>	100	0,4	0,2	0,8
<i>hbb</i>	98,5–100	1,2–1,5	1,2–1,5	4,3
<i>fla</i>	99,5–100	0,6–1,2	1,2–1,8	5,8
<i>groEL</i>	98,7–100	2,2–2,7	2,2–2,7	3,6
<i>recA</i>	97,3–100	0,7–2	2–3,4	6,7
<i>ospA</i>	95,3–100	4,7–8,1	9,5–10,9	8,5
Спейсер <i>rrfA-rrlB</i> Spacer <i>rrfA-rrlB</i>	98,8–100	1,7–2,3	1,7–2,3	4,8
Сцепленные последовательности локусов генов <i>recA</i> и <i>ospA</i> Concatenated sequences of <i>recA</i> and <i>ospA</i> gene loci	96,1–100	3,6–5,6	6,4–7,8	8,3

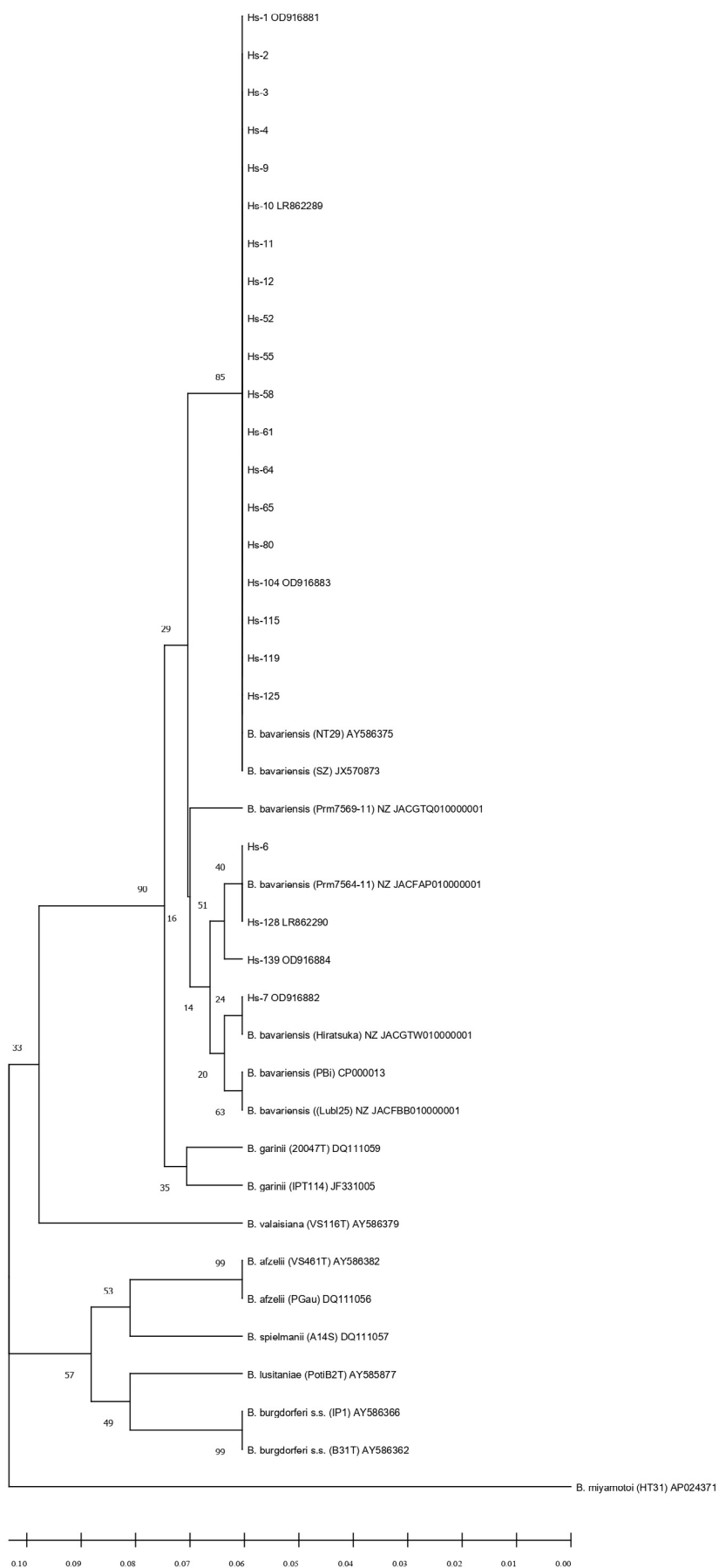


Рис. 1. Дендрогрaмма нуклеотидных последовательностей гена *recA* исследованных изолятов.

Здесь и на рис. 2, 3 в круглых скобках приведено наименование штаммов по базе данных PubMLST *Borrelia* spp.; в квадратных скобках — номера доступа в банках Genbank или ENA. Hs — изоляты от пациентов. Величины bootstrap (1000) указаны в процентах около соответствующего узла.

Для определения коэффициента конгруэнтности между матрицами генетических расстояний генов *recA* и *ospA* по отдельности и в сопоставлении с матрицей сцепленных последовательностей применён тест Мантеля [24] в «Excel» с надстройкой GenALEx — $R = 0,499$ (*recA/ospA*).

Fig. 1. Dendrogram of nucleotide sequences of the *recA* gene in the studied isolates.

Here and in Fig. 2, 3, the names of strains according to the PubMLST *Borrelia* spp. database are given in parentheses; the square brackets were used to show accession numbers assigned by Genbank or ENA. Hs — isolates from patients. The bootstrap (1000) values are shown as percentage near the respective node.

To identify the congruence between matrices of genetic distances of *recA* and *ospA* genes, both separately and against the matrix of concatenated sequences, we used the Mantel test [24] in Excel with the GenALEx add-in — $R = 0.499$ (*recA/ospA*).

лировали проведение более детального анализа внутривидовой гетерогенности нуклеотидных последовательностей генов *recA* и *ospA* на материале наших изолятов *B. bavariensis*, а также их отличий от сиквенсов аналогичных генов у боррелий других видов комплекса *B. burgdorferi sensu lato*.

Детальный анализ дендрограмм последовательностей локусов генов recA и ospA и сравнение этих данных с результатами полного МЛСА

Сиквенсы генов *recA* анализированных нами изолятов показали, что все они попадают в большой кластер с тремя различными аллельными вариантами евразийской генетической подгруппы *B. bavariensis*: нуклеотидные последовательности большинства изолятов (19 из 23) идентичны варианту SZ, 3 — варианту Prm7504-11 и 1 — варианту Hiratsuka (номера доступа GenBank; **рис. 1**). Это объясняет некоторое несходство нуклеотидных последователей локусов этого гена у разных изолятов (табл. 1). Тем не менее все сиквенсы этого гена чёт-

ко отличаются от такового у *B. garinii* и референсных штаммов наиболее распространённых видов *B. burgdorferi sensu lato*, а также от последовательности этого гена у широко распространённой патогенной *B. miyamotoi*, таксономический статус которой остаётся дискуссионным [1]. Аналогичная дендрограмма, построенная по результатам секвенирования локусов гена *ospA* (**рис. 2**), в целом принципиально не отличается от предыдущей.

Результаты МЛСА 6 отобранных изолятов, которые представляют все выявленные нами аллельные варианты генов *recA* и *ospA* *B. bavariensis* (**рис. 1, 2**), показали, что они на 98,5–100,0% сходны с сиквенсами различных изолятов евразийской генетической подгруппы боррелий этого вида (SZ, Prm7564-11, Prm7569-11, Hiratsuka) и несколько менее — с европейскими изолятами, например, с референсным штаммом PVi — на 97,8–98,4%. Вместе с тем все генетические варианты *B. bavariensis*, включая штамм PVi, имеют существенные отличия (т.е. сходство не более 94,9%), позволяющие четко дифференцировать их по данным МЛСА от борре-

Таблица 2. Сходство (в %) некоторых «контрольных» изолятов с боррелиями различных видов, нуклеотидные последовательности которых имеются в базах данных GenBank и PubMLST

Table 2. Similarity (in %) of some “control” isolates with *Borrelia* of various species, the nucleotide sequences of which are available in the GenBank and PubMLST databases

		Hs-7	Hs-10	Hs-55	Hs-104	Hs-128	Hs-139	<i>B. garinii</i> 20047T	<i>B. bavariensis</i>				<i>B. spielmanii</i> A14S	<i>B. burgdorferi</i> s. s. B31T	<i>B. lusitaniae</i> PotiB2T	<i>B. valaisiana</i> VS116T	<i>B. afzelii</i> VS461T
									PVi	NT 29	Prm7564-11	Hiratsuka					
Hs-7		100															
Hs-10		98,9	100														
Hs-55		98,9	100	100													
Hs-104		98,9	100	100	100												
Hs-128		100	98,9	98,8	98,9	100											
Hs-139		99,6	98,9	98,8	98,9	99,7	100										
<i>B. garinii</i> 20047T		97,8	97,6	97,5	97,6	97,7	97,3	100									
<i>B. bavariensis</i>	PVi	98,2	98,4	98,3	98,4	98,1	97,8	98,1	100								
	NT29	98,8	100	99,9	100	98,8	98,8	97,6	98,4	100							
	Prm7564-11	100	98,9	98,8	98,9	100	99,7	97,7	98,1	98,8	100						
	Hiratsuka	100	98,9	98,9	98,9	100	99,6	97,8	98,2	98,8	100	100					
<i>B. spielmanii</i> A14S		94,5	94,5	94,5	94,5	94,4	94,4	94,3	94,0	94,5	94,4	94,5	100				
<i>B. burgdorferi</i> s. s. B31T		93,6	93,5	93,4	93,5	93,5	93,5	93,3	93,2	93,5	93,5	93,6	93,6	100			
<i>B. lusitaniae</i> PotiB2T		93,8	93,9	93,9	93,9	93,7	93,9	93,6	93,5	93,9	93,7	93,8	94	93,3	100		
<i>B. valaisiana</i> VS116T		94,5	94,9	94,9	94,9	94,5	94,4	94,2	94,4	94,6	94,5	94,5	94,3	93,8	94,3	100	
<i>B. afzelii</i> VS461T		93,9	93,9	93,8	93,9	93,9	94,0	94,2	94,0	93,9	93,9	93,9	94,5	94,1	93,1	94,2	100

ких (6–8) генов, затратны, времяёмки и затруднительны [5, 10, 14–16], особенно при необходимости быстрой индикации этиологического агента ИКБ в условиях диагностических лабораторий лечебных учреждений.

Представленный в этой статье детальный анализ данных, полученных ранее и характеризующих генетическую структуру пула изолятов *B. bavariensis* [5, 19], привёл к выводу, что нуклеотидные последовательности локусов генов *recA* и *ospA* в наибольшей степени отличаются от последовательностей других генов, рекомендованных протоколом МЛСА для индикации распространённых видов комплекса *B. burgdorferi sensu lato*. Ранее были предприняты попытки достижения этой цели на основе разнообразия структуры отдельно каждого из генов *recA* и *ospA* [21, 22]. Сравнение таких наших данных (рис. 1 и 2) показывает, что они дают близкие, но не идентичные результаты генотипической принадлежности некоторых изолятов. Однако дендрограмма сцепленных нуклеотидных последовательностей локусов генов *recA* и *ospA* (рис. 3) демонстрирует точно такую же видовую и геновариантную принадлежность изолятов, как и ранее полученные результаты их типирования в соответствии с полным протоколом МЛСА.

Для проведения «контрольного» исследования, соответствующего задаче статьи, нами использован репрезентативный пул изолятов *B. bavariensis*, видовая принадлежность и гетерогенность которых были предварительно изучены этим методом и известны [5]. Сцепленные нуклеотидные последовательности локусов генов *recA* и *ospA*, принадлежащие референсным штаммам каждого из наиболее распространённых видов группы *B. burgdorferi sensu lato* (рис. 3), чётко различаются. Поэтому видовая принадлежность вновь исследуемого образца может быть выявлена путём расчёта максимального сходства сцепленных последовательностей этих двух его генов с аналогичными последовательностями определённых видов боррелий данной группы, включая *B. bavariensis*, или построением аналогичной дендрограммы. Для оптимизации регулярных лабораторных исследований её неизменный «шаблон» по типу рис. 3 может храниться в виде файла (например, в программе MEGA или другой). Простое сопоставление числа генов, рекомендованных протоколами МЛСА и МЛСТ, с их числом, которое по представленным нами данным необходимо и достаточно секвенировать для определения уже известного науке вида возбудителя ИКБ, показывает, что трудовые и финансовые затраты могут быть при этом сокращены примерно в 3–4 раза.

Специального дальнейшего изучения заслуживает возможность дифференциации боррелий группы *B. burgdorferi sensu lato* от *B. miyamotoi* по их нуклеотидным последовательностям гена *recA*, су-

щественные отличия которых подтверждают наши данные (рис. 1). Это может иметь важное значение для совершенствования генодиагностики этиологии ИКБ, тем более что известен прецедент использования этого гена в совокупности с двумя другими для лабораторного подтверждения заболевания, вызванного *B. miyamotoi* [23].

Заключение

На основании исследований, приведённых выше, мы предлагаем оптимизированный подход к МЛСА боррелий группы *B. burgdorferi sensu lato*. Он сводится к выявлению их видовой принадлежности на основании специфики результата сцепленного анализа локусов только 2 генов (*recA* и *ospA*) из 6, а также спейсера *rrfA-rrlB*, рекомендованных протоколом данного метода. Это значительно сокращает затраты и ускоряет лабораторное исследование идентифицируемых образцов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Коренберг Э.И., Помелова В.Г., Осин Н.С. *Природноочаговые инфекции, передающиеся иксодовыми клещами*. М.: Комментарий; 2013.
2. Рудакова С.А., Пеньевская Н.А., Блох А.И., Рудаков Н.В., Транквилевский Д.В., Савельев Д.А. и др. Обзор эпидемиологической ситуации по иксодовым клещевым боррелиозам в Российской Федерации в 2010–2020 гг. и прогноз на 2021 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; (2): 52–61. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-2-52-61>
3. Margos G., Castillo-Ramirez S., Cutler S., Dessau R.B., Eikeland R., Estrada-Peña A., et al. Rejection of the name *Borrelia* and all proposed species comb. nov. placed therein. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020; 70(5): 3577–81. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004149>
4. Нефедова В.В., Коренберг Э.И., Горелова Н.Б. Мультилокусный сиквенса-анализ "нетипичных" *Borrelia burgdorferi sensu lato*, изолированных в России. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2017; 35(4): 145–50. <https://doi.org/10.3103/S0891416817040073>
5. Голидонова К.А., Коренберг Э.И., Горелова Н.Б., Гинцбург А.Л. Мультилокусный сиквенса-анализ изолятов от больных эритемной формой иксодового клещевого боррелиоза. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2021; 39(4): 14–20. <https://doi.org/10.3103/S089141682104008X>
6. Тетерин В.Ю., Коренберг Э.И., Нефедова В.В., Воробьева Н.Н., Фризен В.И., Помелова В.Г. и др. Клинико-лабораторная диагностика инфекций, передающихся иксодовыми клещами, в Пермском крае. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2013; (4): 11–5.
7. Фоменко Н.В., Романова Е.В., Караваева Ю.Ю., Панов В.В., Черноусова Н.Я., Ливанова Н.Н. Разнообразие *Borrelia burgdorferi sensu lato* в природных очагах Новосибирской области. *Бюллетень Сибирской медицины*. 2006; 5(S1): 93–8. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2006-5-S1-93-98>
8. Branda J.A., Steere A.C. Laboratory diagnosis of Lyme borreliosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2021; 34(2): e00018-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00018-19>
9. 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.

10. Radolf J., Samuels S. *Lyme Disease and Relapsing Fever Spirochetes: Genomics, Molecular Biology, Host Interactions and Disease Pathogenesis*. Caister Academic Press Limited; 2021. <https://doi.org/10.21775/9781913652616>
11. Платонов А.Е., Миронов К.О., Яцышина С.Б., Королева И.С., Платонова О.В., Гуцин А.Е. и др. Характеристика московских штаммов *Haemophilus influenzae* типа b методом мультилокусного секвенирования-типирования. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2003; (2): 21–5.
12. Мухачева Т.А., Ковалев С.Ю. Мультилокусное сиквенс-типирование боррелий на территории России: промежуточные итоги и перспективы. *Национальные приоритеты России*. 2014; (3): 110–3.
13. Слукин П.В., Асташкин Е.И., Асланын Е.М., Ершова М.Г., Полетаева Е.Д., Светоч Э.А. и др. Характеристика вирулентных штаммов *Escherichia coli*, выделенных от пациентов с урологической инфекцией. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021; 98(6): 671–84. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-134>
14. Margos G., Gatewood A.G., Aanensen D.M., Hanincová K., Terekhova D., Vollmer S.A., et al. MLST of housekeeping genes captures geographic population structure and suggests a European origin of *Borrelia burgdorferi*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2008; 105(25): 8730–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800323105>
15. Richter D., Postic D., Sertour N., Livey I., Matuschka F.R., Baranton G. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2006; 56(Pt. 4): 873–81. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64050-0>
16. Голидонова К.А., Коренберг Э.И., Крупинская Е.С. Сравнительный анализ результатов исследования изолятов боррелий методами мультилокусного сиквенс-анализа (MLSA) и типирования (MLST). *Национальные приоритеты России*. 2021; (3): 141–5.
17. Нефедова В.В., Тетерин В.Ю., Коренберг Э.И., Горелова Н.Б., Воробьева Н.Н., Фризен В.И. Изоляция возбудителя иксодового клещевого боррелиоза из крови больных. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2009; (1): 63–6.
18. Нефедова В.В., Коренберг Э.И., Горелова Н.Б. Генетические варианты *Borrelia garinii* — широко распространенного евразийского возбудителя заболеваний группы иксодовых клещевых боррелиозов. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2010; (3): 7–12.
19. Голидонова К.А., Коренберг Э.И., Горелова Н.Б. Генетический анализ структуры некоторых генов домашнего хозяйства боррелий, вызывающих эритемную форму иксодового клещевого боррелиоза. В кн.: *Сборник материалов VII Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания»*. Сочи; 2020: 49–50.
20. Margos G., Vollmer S.A., Ogden N.H., Fish D. Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Infect. Genet. Evol.* 2011; 11(7): 1545–63. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.07.022>
21. Casati S., Bernasconi M.V., Gern L., Piffaretti J.C. Diversity within *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in Switzerland by *recA* gene sequence. *FEMS Microbiol. Lett.* 2004; 238(1): 115–23. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09745.x>
22. Will G., Jauris-Heipke S., Schwab E., Busch U., Rossler D., Soutschek E., et al. Sequence analysis of *ospA* genes shows homogeneity within *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii* strains but reveals major subgroups within the *Borrelia garinii* species. *Med. Microbiol. Immunol.* 1995; 184(2): 73–80. <https://doi.org/10.1007/BF00221390>
23. Александров Г.О., Карпова М.Р., Потоцкая Ю.А., Бондаренко Е.И., Стронин О.В., Лукашова Л.В. Определение *Borrelia miyamotoi* — возбудителя клещевой возвратной лихорадки в клещах и крови пациента в Томской области. В кн.: *Молекулярная диагностика – 2017: сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием*. М.; 2017: 338–9.
24. Mantel N., Valand R.S. A technique of nonparametric multivariate analysis. *Biometrics*. 1970; 26(3): 547–58.

REFERENCES

1. Korenberg E.I., Pomelova V.G., Osin N.S. *Infections with Natural Focality Transmitted by Ixodid Ticks [Prirodnoochagovye infektsii, peredayushchiesya iksodovymi kleshchami]*. Moscow: Kommentariy; 2013. (in Russian)
2. Rudakova S.A., Pen'evskaya N.A., Blokh A.I., Rudakov N.V., Trankvilevskiy D.V., Savel'ev D.A., et al. Review of the epidemiological situation on ixodid tick-borne borreliosis in the Russian Federation in 2010–2020 and prognosis for 2021. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2021; (2): 52–61. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-2-52-61> (in Russian)
3. Margos G., Castillo-Ramirez S., Cutler S., Dessau R.B., Eikeland R., Estrada-Peña A., et al. Rejection of the name *Borreliella* and all proposed species comb. nov. placed therein. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020; 70(5): 3577–81. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004149>
4. Nefedova V.V., Korenberg E.I., Gorelova N.B. Multilocus sequence analysis of “atypical” *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolated in Russia. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2017; 32(4): 196–203. <https://doi.org/10.3103/S0891416817040073>
5. Golidonova K.A., Korenberg E.I., Gorelova N.B., Gintsburg A.L. Multilocus sequence analysis of isolates from patients with the erythemic form of ixodid tick-borne borreliosis. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2021; 39(4): 14–20. <https://doi.org/10.3103/S089141682104008X> (in Russian)
6. Teterin V.Yu., Korenberg E.I., Nefedova V.V., Vorob'eva N.N., Frizen V.I., Pomelova V.G., et al. Clinical and laboratory diagnosis of infections transmitted by ixodes ticks in the Perm Krai. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni*. 2013; (4): 11–5. (in Russian)
7. Fomenko N.V., Romanova E.V., Karavaeva Yu. Yu., Panov V.V., Chernousova N.Ya., Livanova N.N. Diversity *Borrelia burgdorferi* sensu lato in natural foci of Novosibirsk region. *Byulleten' Sibirskoy meditsiny*. 2006; 5(S1): 93–8. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2006-5-S1-93-98> (in Russian)
8. Branda J.A., Steere A.C. Laboratory diagnosis of Lyme borreliosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2021; 34(2): e00018-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00018-19>
9. Platonov A.E., Shipulin G.A., Platonova O.V. Multilocus sequencing — a new method of genotyping bacteria and first results of its use. *Genetika*. 2000; 36(5): 597–605. (in Russian)
10. Radolf J., Samuels S. *Lyme Disease and Relapsing Fever Spirochetes: Genomics, Molecular Biology, Host Interactions and Disease Pathogenesis*. Caister Academic Press Limited; 2021. <https://doi.org/10.21775/9781913652616>
11. Platonov A.E., Mironov K.O., Yatsyshina S.B., Koroleva I.S., Platonova O.V., Gushchin A.E., et al. Multilocus sequence-typing for characterization of Moscow strains of *Haemophilus influenzae* type B. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2003; (2): 21–5. (in Russian)
12. Mukhacheva T.A., Kovalev S.Yu. Multilocus sequence typing of *Borrelia* species in Russia: interim results and perspectives. *Natsional'nye priority Rossii*. 2014; (3): 110–3. (in Russian)
13. Slukin P.V., Astashkin E.I., Aslanyan E.M., Ershova M.G., Poletaeva E.D., Svetoch E.A., et al. Characterization of virulent

- Escherichia coli* strains isolated from patients with urological infection. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021; 98(6): 671–84. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-134> (in Russian)
14. Margos G., Gatewood A.G., Aanensen D.M., Hanincová K., Terekhova D., Vollmer S.A., et al. MLST of housekeeping genes captures geographic population structure and suggests a European origin of *Borrelia burgdorferi*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2008; 105(25): 8730–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800323105>
 15. Richter D., Postic D., Sertour N., Livey I., Matuschka F.R., Baranton G. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2006; 56(Pt. 4): 873–81. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64050-0>
 16. Golidonova K.A., Korenberg E.I., Krupinskaya E.S. Comparative analysis of the results of studying *Borrelia* isolates by multilocus sequence analysis (MLSA) and typing (MLST). *Natsional'nye priority Rossii*. 2021; (3): 141–5. (in Russian)
 17. Nefedova V.V., Teterin V.Yu., Korenberg E.I., Gorelova N.B., Vorob'eva N.N., Frizen V.I. Isolation of tick-borne borreliosis agent from blood of patients. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii*. 2009; (1): 63–6. (in Russian)
 18. Nefedova V.V., Korenberg E.I., Gorelova N.B. Genetic variants of *Borrelia garinii*, a widespread Eurasian pathogen of ixodid tick borreliosis. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2010; 25(3): 95–100.
 19. Golidonova K.A., Korenberg E.I., Gorelova N.B. Genetic analysis of the structure of some genes of the household of borrelia causing the erythemic form of ixodic tick-borne borreliosis. In: *Collection of Materials of the VII All-Russian Interdisciplinary Scientific and Practical Conference with International Participation «Socially Significant and Especially Dangerous Infectious Diseases» [Sbornik materialov VII Vserossiyskoy mezhdistsiplinarnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem «Sotsial'no-znachimye i osobo opasnye infektsionnye zabolevaniya»]*. Sochi; 2020: 49–50. (in Russian)
 20. Margos G., Vollmer S.A., Ogden N.H., Fish D. Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Infect. Genet. Evol.* 2011; 11(7): 1545–63. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.07.022>
 21. Casati S., Bernasconi M.V., Gern L., Piffaretti J.C. Diversity within *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in Switzerland by recA gene sequence. *FEMS Microbiol. Lett.* 2004; 238(1): 115–23. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09745.x>
 22. Will G., Jauris-Heipke S., Schwab E., Busch U., Rossler D., Soutschek E., et al. Sequence analysis of ospA genes shows homogeneity within *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii* strains but reveals major subgroups within the *Borrelia garinii* species. *Med. Microbiol. Immunol.* 1995; 184(2): 73–80. <https://doi.org/10.1007/BF00221390>
 23. Aleksandrov G.O., Karpova M.R., Pototskaya Yu.A., Bondarenko E.I., Stronin O.V., Lukashova L.V. Determination of *Borrelia miyamotoi* — the causative agent of tick-borne recurrent fever in ticks and blood of a patient in the Tomsk region. In: *Molecular Diagnostics – 2017: Proceedings of the IX All-Russian Scientific and Practical Conference with International Participation [Molekulyarnaya diagnostika – 2017: sbornik trudov IKh Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem]*. Moscow; 2017: 338–9. (in Russian)
 24. Mantel N., Valand R.S. A technique of nonparametric multivariate analysis. *Biometrics*. 1970; 26(3): 547–58.

Информация об авторах

Голидонова Кристина Андреевна[✉] — н.с. ФГБУ НИЦЭМ им. почётного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, kristi.dekor@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4832-6248>

Коренберг Эдуард Исаевич — д.б.н.; профессор, зав. лаб. переносчиков инфекций; ФГБУ НИЦЭМ им. почётного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4452-4231>

Гинцбург Александр Леонидович — д.б.н.; профессор, академик РАН; директор ФГБУ НИЦЭМ им. почётного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>

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 21.06.2022;

принята к публикации 13.09.2022;

опубликована 30.10.2022

Information about the authors

Kristina A. Golidonova[✉] — researcher, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, kristi.dekor@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4832-6248>

Edward I. Korenberg — Cand. Sci. (Biol.), Professor, Head, Laboratory of Vectors of Infections, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4452-4231>

Alexander L. Gintsburg — Cand. Sci. (Biol.), Professor, RAS Full Member, Director, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>

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 21.06.2022;

accepted for publication 13.09.2022;

published 30.10.2022



Каскад медицинской помощи детям с инфекцией, вызванной вирусом гепатита С, в Московской области

Мескина Е.Р.^{1✉}, Галкина Л.А.¹, Целипанова Е.Е.¹, Одинаева Н.Д.^{1,2}

¹Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия;

²Научно-клинический институт детства, Мытищи, Россия

Аннотация

Актуальность. Детям и подросткам с инфекцией, вызванной вирусом гепатита С (ВГС), уделялось недостаточно внимания из-за более лёгкого течения и отставания одобрения схем противовирусной терапии. Следует устранить пробелы исследований в педиатрических когортах и недостатки политики ведения детей, обеспечив организацию доступа к тестированию и лечению.

Цель исследования — представить результаты каскадной последовательности мер оказания медицинской помощи детям с ВГС в Московской области (МО).

Материалы и методы. Включены все серопозитивные к ВГС дети МО ($n = 175$), прошедшие скрининговое тестирование, и не включены пациенты, живущие с коинфекцией ВИЧ/ВГС. Дети наблюдались в 2017–2022 гг. РНК ВГС определена у 164 и его генотипирование — у 99. Стадия фиброза печени оценена у 73 детей с помощью транзитной эластографии и расчёта индекса FIB-4.

Результаты. В МО охват тестированием на РНК ВГС-серопозитивных детей составил 93,7%, пролечено 71,2% подростков старше 12 лет. Распространённость серопозитивности к ВГС оценивается как не менее 0,113/1000 детского населения, хронической ВГС-инфекции — как не менее 0,059/1000. Доминировали субтипы G1b (43,4% [95% доверительный интервал 33,5–53,8%]), G3a (23,2% [15,3–32,8%]) и G3a/3b (20,2% [12,8–29,5%]). Заболеваемость вирусемической ВГС на 100 тыс. детей составила 3,3 у детей младше 3 лет; 7,0 — у детей 3–6 лет; 7,7 — у детей 7–11 лет, 4,4 — у подростков старше 12 лет. Естественный клиренс ВГС зарегистрирован с частотой 19,5% [13,8–26,4%]. Внепечёночные проявления встречались редко — 2,9% [0,9–6,5%]. Основной путь передачи ВГС — вертикальный (78,3% [71,4–84,2%]), предполагаемое заражение при медицинских инвазивных процедурах — 7,4% [4,0–12,4%], употреблении наркотиков — 0,6% [0,01–3,10%], в семейном очаге — 0,6% [0,01–3,10%]. Новые случаи ВГС-инфекции выявлялись чаще при плановом обследовании детей перед госпитализацией или у рождённых от матерей с ВГС. Вирусемическая ВГС подтверждена у 90,2% [84,6–94,3%], в том числе ВГС-инфекция — у 53,4% [45,0–61,6%], хроническая болезнь печени — у 35,8% [28,1–44,1%] с низкой степенью активности и редкими последствиями (фиброз по шкале METAVIR F1 и F1-2 — 17,8% [9,8–28,5%]). Не установлено существенных клинико-эпидемиологических отличий между естественным течением хронической ВГС-инфекции и болезни печени, вызванной ВГС. Бремя педиатрической ВГС в МО утяжелено значительной долей социально уязвимых и коморбидных пациентов.

Заключение. Резервом для выявления новых случаев ВГС-инфекции в МО у детей может быть укрепление преемственности между медицинскими организациями и раннее лечение женщин детородного возраста. Необходимы исследования, чтобы оценить эффективность рутинного тестирования всех социально уязвимых педиатрических групп. Раннее применение пангенотипных схем противовирусной терапии, вероятно, быстро позволяет контролировать заболеваемость ВГС-инфекцией у детей.

Ключевые слова: каскад медицинской помощи, дети, вирус гепатита С, ВГС-инфекция, болезнь печени, вызванная вирусным гепатитом С, хронический гепатит С, генотипы ВГС, пути передачи ВГС, результаты скринингового тестирования

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии законных представителей несовершеннолетних пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом МОНКИ им. М.Ф. Владимирского (протокол № 9 от 14.03.2019).

Источник финансирования. Тема исследования финансировалась Министерством здравоохранения Московской области в рамках перечня научно-исследовательских работ ГБУЗ МО МОНКИ им. М.Ф. Владимирского по Государственному заданию на 2020–2024 гг. от 15.01.2020.

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

Для цитирования: Мескина Е.Р., Галкина Л.А., Целипанова Е.Е., Одинаева Н.Д. Каскад медицинской помощи детям с инфекцией, вызванной вирусом гепатита С, в Московской области. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(5):525–539.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-330>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-330>

Hepatitis C virus care cascade for children in Moscow Region

Elena R. Meskina^{1✉}, Lidiya A. Galkina¹, Elena E. Tselipanova¹, Nuriniso D. Odinaeva²¹Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russia;²Research Clinical Institute of Childhood, Mytishchi, Russia

Abstract

Background. Children and adolescents with infection caused by the hepatitis C virus (HCV) have not been given sufficient attention due to mild forms of HCV and delays in approval of antiviral treatment regimens. Omissions in the studies of pediatric cohorts and shortcomings of management policies aimed at children should be eliminated by improving screening coverage and access to treatment.

The aim of the study was to present the results of the cascade sequence of diagnostic testing, care and treatment of children with HCV in the Moscow Region (MR).

Materials and methods. The study included all HCV seropositive children of MR ($n = 175$), who underwent screening tests, and it did not include patients living with HIV/HCV coinfection. Children were observed from 2017 to 2022. The HCV RNA was detected in 164 children and HCV genotypes were identified in 99 children. The stage of liver fibrosis was assessed in 73 children by transient elastography and by FIB-4 index calculation.

Results. In MR, 93.7% of seropositive children were tested for HCV RNA; 71.2% of adolescents over 12 years of age received treatment. The prevalence of HCV seropositivity was estimated at 0.113/1,000 children population; the prevalence of chronic HCV infection was at least 0.059/1,000. The dominant HCV subtypes were GT 1b (43.4% [the 95% confidence interval, 33.5–53.8%]), GT 3a (23.2% [15.3–32.8%]) and GT 3a/3b (20.2% [12.8–29.5%]). The incidence of viremic HCV infection per 100,000 children was 3.3 among children under 3 years of age; 7.0 – among children aged 3–6 years; 7.7 – among children aged 7–11 years, 4.4 – among adolescents older than 12 years. Natural HCV clearance was reported at the frequency of 19.5% [13.8–26.4%]. Extrahepatic manifestations were of rare occasion – 2.9% [0.9–6.5%]. Vertical transmission was the primary route of HCV transmission (78.3% [71.4–84.2%]); infection is assumed to occur during medical invasive procedures – 7.4% [4.0–12.4%], drug using – 0.6% [0.01–3.10%], in the family household – 0.6% [0.01–3.10%]. New cases of HCV infection were more frequently detected during routine examination of children prior to hospitalization or children born to mothers with HCV. Viremic HCV was confirmed in 90.2% [84.6–94.3%], including HCV infection – in 53.4% [45.0–61.6%], chronic liver disease – in 35.8% [28.1–44.1%] having low activity and occasional consequences (the fibrosis METAVIR score of F1 and F1-2 – 17.8% [9.8–28.5%]). No significant clinical and epidemiological differences between the natural course of chronic HCV infection and the liver disease caused by HCV have been found. The burden of pediatric HCV in MR is aggravated by a significant proportion of socially vulnerable patients and patients with comorbid conditions.

Conclusion. One of the solutions for detection of new pediatric cases of HCV infection in MR can be offered by improvement of collaboration and continuity of care among healthcare organizations and early treatment of women of childbearing age. Further research is required to evaluate the effectiveness of routine testing of all socially vulnerable pediatric groups. Early application of pan-genotypic antiviral treatment regimens can contribute significantly to control of the HCV infection incidence in children.

Keywords: *testing and treatment cascade, children, hepatitis C virus, HCV infection, liver disease caused by viral hepatitis C, chronic hepatitis C, HCV genotypes, HCV transmission routes, screening test results*

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the legal representatives of minor patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Moscow Regional Research and Clinical Institute (protocol No. 9, March 14, 2019).

Funding source. The study was supported by the Health Ministry of the Moscow Region as the research within the program commissioned to the Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute, State-Financed Health Institution of the Moscow Region by the Government for 2020–2024 as of 15/1/2020.

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

For citation: Meskina E.R., Galkina L.A., Tselipanova E.E., Odinaeva N.D. Hepatitis C virus care cascade for children in Moscow Region. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(5):525–539.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-330>

Хроническая инфекция, вызванная вирусом гепатита С (ВГС-инфекция), представляет серьёзную угрозу общественному здоровью, сопоставимую с вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) и

туберкулёзом. Всемирная ассамблея здравоохранения определила ВГС в качестве приоритета систем здравоохранения и в 2016 г. одобрила Глобальную стратегию сектора здравоохранения с достижением

сокращения новых случаев на 90% к 2030 г.¹ Учитывая масштабы усилий, необходимых для достижения этих амбициозных целей, в качестве этапа элиминации ВГС на глобальном уровне может быть использована концепция «микроэлиминации» в целевых группах пациентов, в том числе среди детей и подростков, проживающих на конкретной территории [1].

До настоящего времени детям и подросткам уделялось недостаточно внимания, главным образом из-за более лёгкого течения ВГС и отставания одобрения схем противовирусной терапии (ПВТ) в педиатрии [2]. Глобальная распространённость ВГС в педиатрической популяции сильно варьирует в различных странах, может достигать 0,13% и увеличивается с возрастом по всему миру [3]. Отмечается прирост заболеваемости ВГС среди подростков в некоторых странах, ассоциированный с широкой практикой татуировок, пирсинга и поведения высокого риска [4]. По некоторым данным, совокупность инфицированных ВГС детей в России — самая крупная в Европе (6-е место в глобальном масштабе) [3] с существенным преобладанием подростков [5, 6].

Имеются сведения, что в России четверть регулярно наблюдающихся детей инфицированы при оказании медицинских процедур, их средний возраст не превышает 2 лет [7], что значительно отличается от европейских показателей и отражает существующие недостатки раннего выявления ВГС у подростков. В течение 2016–2020 гг. заболеваемость детей и взрослых в России постепенно снижалась [6], однако регистрация новых случаев может быть неоптимальной [8], поскольку у многих инфицированных подростков отсутствовали показания для тестирования [9]. По опубликованным данным, половина инфицированных ВГС в России детей живёт с хроническим гепатитом (ХГС), а степень фиброза печени (ФП) прогрессирует к возрасту 15 лет [7].

Каскад медицинской помощи (КМП) при инфекции ВГС (рутинное тестирование, диагностика, динамическое наблюдение и начало лечения) не оптимален как в России [10, 11], так и в других странах [9]. В настоящее время доступны новые технологии, упрощающие комплекс КМП и повышающие возможности его реализации, которые могут быть залогом успешного продвижения по пути элиминации ВГС.

Основные действия по устранению существующих пробелов в политике ведения детей и подростков с ВГС-инфекцией в сравнении со взрослыми должны включать: организацию кампании доступа

к тестированию и лечению, ориентированной на детей и подростков; ускоренную оценку пангенотипных схем лечения и ускоренное одобрение педиатрических составов ПВТ [4]. Следует устранить пробелы исследований в педиатрических когортах и сконцентрироваться на изучении распространённости вирусемии ВГС в возрастных группах в приоритетных странах, дальнейшей валидации неинвазивных тестов для определения стадии заболевания печени у детей, создании педиатрических регистров лечения и международных консорциумов для продвижения программ совместных исследований.

Учитывая неоднородность оценок распространения ВГС на различных территориях, необходимо получение точной клинико-эпидемиологической характеристики инфекции ВГС у детей в Московской области (МО) для понимания её истинного бремени. Полученные данные могут быть использованы для определения приоритетных методологических подходов и формирования политики системы здравоохранения, направленной на элиминацию ВГС среди детей и подростков в МО.

Цель исследования — представить результаты каскадной последовательности мер оказания медицинской помощи детям с инфекцией, вызванной ВГС, в МО.

Материалы и методы

Тип исследования — продольное наблюдательное (неинтервенционное) клинико-эпидемиологическое исследование. Тема исследования утверждена Министерством здравоохранения МО в рамках перечня научно-исследовательских работ МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского в рамках государственного задания на 2020–2024 гг. от 15.01.2020.

КМП пациентам с ВГС включает рутинное тестирование населения и целевых когорт с определением антител к ВГС (анти-ВГС), привязку к централизованно организованной системе оказания медицинской помощи в МО, диагностику вирусемической инфекции и болезни печени, наблюдение для раннего выявления последствий ВГС, осложнений, сопутствующих заболеваний и состояний, раннее начало лечения, мониторинг ответа на лечение.

Тестирование с определением анти-ВГС проведено в соответствии с требованиями эпидемиологического надзора за вирусными гепатитами В и С, регламентированными Санитарными правилами и нормами Российской Федерации [12]. Учтены результаты рутинного и целевого тестирования на ВГС.

В исследование включены все серопозитивные к ВГС дети и подростки МО, прошедшие тестирование, в том числе дети с перинатальным контактом, у которых подтверждена вирусемическая инфекция либо анти-ВГС сохранялись более 18 мес. Всего в 2017–2022 гг. к наблюдению были прикреплены

¹ ВОЗ. Глобальная стратегия сектора здравоохранения по вирусному гепатиту на 2016–2021: на пути к ликвидации вирусного гепатита; 2016.
URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/250042>

175 детей и подростков с положительным скрининговым тестом. Информация о пациентах извлечена из медицинских карт пациентов, получающих медицинскую помощь в амбулаторных условиях (форма № 112/у), выписок из медицинских карт амбулаторного или стационарного больного (форма № 027/у), собственной базы данных наблюдения за пациентами, а также собрана при сборе анамнеза у законных представителей. Путём стандартного опроса родителей или опекунов были получены данные о наличии перинатального контакта ВГС или других возможных способах передачи ВГС, сроках инфицирования, сопутствующих заболеваниях в анамнезе, социальных факторах (в том числе наличие членов семьи с ВГС и коинфекцией), влияющих на течение ВГС у наблюдаемых пациентов. В исследовании учтены результаты анамнестического обследования пациентов.

В исследование не включены пациенты, живущие с коинфекцией ВИЧ + ВГС, наблюдающиеся в Центре по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями.

Определение количественного содержания РНК ВГС ($n = 164$) и его генотипирование ($n = 99$) проведены у детей методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции с применением тест-систем «ОТ-ГЕПАТОГЕН-С количественный с детекцией в режиме реального времени» и «ОТ-ГЕПАТОГЕН-С ГЕНОТИП» (ООО «НПО ДНК-Технология») в лаборатории СПИД и вирусных гепатитов МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского. Сывороточный уровень общего билирубина и активность аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспаратаминотрансферазы (АСТ) определены у 152 (86,9%) пациентов. Нормальные уровни АЛТ и АСТ зависят от возраста. Использовалась верхняя граница референсного интервала для АСТ и АЛТ, равная 40 МЕ/л, чтобы можно было сравнить результаты с данными литературы.

Для определения последствий ВГС-инфекции (степени ФП) применяли рекомендованные неинвазивные методы, наиболее приемлемые в педиатрии [13]. Определение жёсткости печени с помощью транзитной эластографии проведено у 43 (24,6%) пациентов, преимущественно у детей с болезнью печени, с помощью аппарата для неинвазивного определения ФП «FibroScan 502 TOUCH» с ультразвуковым датчиком («ECHOSENS»). Результаты транзитной эластографии были классифицированы как норма ($< 5,0$ кПа по шкале METAVIR 0), лёгкое повышение (от 5,0 до $< 7,0$ кПа, по шкале METAVIR 1), умеренное повышение (от 7,0 до $< 9,0$ кПа, по шкале METAVIR 2), сильное повышение ($\geq 9,0$ кПа); предиктор тяжёлого ФП ($\geq F3$) (≥ 9 кПа) [13, 14]. У 30 (17,1%) пациентов стадию ФП рассчитывали с использованием индекса FIB-4 по формуле: $FIB-4 = \text{возраст (лет)} \times \text{АСТ/тромбоци-$

ты ($10^9/\text{л}$) $\times \sqrt{\text{АЛТ}}$. При значении $FIB-4 < 1,45$ можно судить об отсутствии значимого ФП, при значении $FIB-4 > 3,25$ с большей вероятностью можно утверждать о наличии ФП стадии 4–6 по шкале Ishak с достаточной чувствительностью и специфичностью [15]. По показаниям 55 (31,4%) пациентам проведено ультразвуковое исследование органов брюшной полости.

Законные представители детей подписали информированное согласие на использование персональных данных для анализа, обобщения и опубликования результатов с соблюдением принципов конфиденциальности.

В настоящем отчёте об исследовании применены следующие термины с соответствующими определениями.

Хроническая инфекция, вызванная вирусом гепатита С (ХГС), определялась как обнаруживаемая РНК ВГС в 2 или более образцах крови с интервалом не менее 6 мес. Для детей, не инфицированных вертикально, продолжительность диагностированной инфекции рассчитывалась как время от даты верификации диагноза.

Болезнь печени, вызванная ВГС (или ХГС), определялась как обнаружение повышенного уровня АЛТ и АСТ у ребёнка с определяемой РНК ВГС с наличием критериев ФП или без такового.

Пути передачи инфекции: вертикальный путь передачи (известно, что у матери ВГС), подозрение на инфекцию, связанную с оказанием медицинской помощи (история получения продуктов крови или инвазивных процедур в медицинских учреждениях и отсутствие в анамнезе ВГС у матери и других членов семьи), употребление инъекционных наркотиков или неизвестно.

Успешный результат лечения препаратами прямого противовирусного действия (ПППД) определяется как устойчивый вирусологический ответ (отсутствие РНК ВГС) через 12 нед (УВО12) и 24 нед (УВО24) после окончания лечения².

Статистическая обработка результатов проведённого исследования выполнена с использованием пакетов программ «Microsoft Excel 2011» и «Statistica 6.0» («StatSoft Inc.»). Дискретные признаки представлены в виде частоты событий, выраженной в процентах от общего числа пациентов в группе. Распространённость ВГС рассчитана как число случаев на 1000 детского населения, в том числе в соответствующих возрастных группах, и представлена в промилле. Заболеваемость рассчитана как число случаев на 100 тыс. детского населения. При сравнении качественных признаков использован

² WHO Monitoring and evaluation for viral hepatitis B and C: recommended indicators and framework. Technical report. Geneva; 2016. URL: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204790/1/9789241510288_eng.pdf

критерий χ^2 Пирсона или точный критерий Фишера при числе наблюдений в одной из ячеек четырёхпольной таблицы менее 5, либо χ^2 для произвольных таблиц. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Качественное суждение о значимости статистических отличий проводили с помощью 95% доверительного интервала (ДИ) для долей.

Для оценки величины эффекта использовались критерии, отношение рисков события в сравниваемых группах, сокращение относительного риска, сокращение абсолютного риска, отношение шансов (ОШ) события к отсутствию шансов события в сравниваемых группах с расчётом ДИ. ОШ < 1 свидетельствует о снижении риска, ОШ = 1 — об отсутствии эффекта, ОШ > 1 — об увеличении риска.

Результаты

Показатели охвата тестированием и лечением детей с ВГС-инфекцией в Московской области

На 01.06.2022 в МО выявлено 175 детей с положительным тестом анти-ВГС, из них определение РНК ВГС было выполнено у 164 (93,7%) пациентов. Неопределённый статус ВГС к моменту публикации статьи имеют 11 детей, в том числе 9 продолжающих наблюдение и 2 подростка, закончивших наблюдение по достижении 18 лет. Виремическая ВГС была подтверждена у 148 детей (90,2% [84,6–94,3%] от числа тестированных с определением РНК ВГС) и у 16 (9,8% [5,7–16,4%]) изначально подтверждена ВГС-инфекция, перенесённая в анамнезе с естественным клиренсом вируса (2 отрицательных теста РНК ВГС с интервалом 6 мес). В течение 2017–2022 гг. естественный клиренс ви-

руса констатирован ещё у 16 пациентов, и в целом (до прикрепления к КМП или во время наблюдения) его частота составила 19,5% [13,8–26,4%].

До прикрепления к организованной в МО КМП дасабувир + омбитасвир + паритапревир + ритонавир (G1 ВГС) получили 3 подростка, софосбувир — ещё 3 подростка с достижением УВО24, пегилированный интерферон альфа-2b + рибавирин — 8 детей, в том числе с УВО24 — 4 ребёнка (половина случаев). К настоящему времени в России лицензировано и доступно лечение ХГС у подростков старше 12 лет с применением пангенотипных схем ПППД. За период наблюдения подлежало лечению 52 подростка, из них к моменту публикации глекапревир + пибрентасвир получили 37 детей (71,2%, в том числе 2 получавших безуспешно интерфероновую схему) с достижением УВО24 в 97,3% случаев.

К моменту публикации из 100 детей, прикрепленных к КМП, с текущей ХГС-инфекцией живёт 91 ребёнок (у 9 детей тестирование с определением РНК ВГС не выполнено). Статус наблюдения в 2017–2020 гг. инфицированных ВГС детей представлен в **табл. 1**.

Из табл. 1 видно, что максимальное количество как новых, так и подтверждённых ранее случаев инфицирования ВГС зарегистрировано в централизованном педиатрическом КМП МО на 3-й год его работы. В течение 2020–2022 гг. доля новых выявленных случаев, прикрепленных к КМП, увеличивалась последовательно (42,9, 51,6 и 85,1% соответственно; $p = 0,029$), хотя по-прежнему каждый год в течение 5 лет к динамическому наблюдению были прикреплены дети, имеющие длительный анамнез ВГС.

Таблица 1. Динамика статуса наблюдения детей с анти-ВГС в МО в течение 2017–2022 гг. ($n = 175$)

Table 1. Dynamics of the observation status for children with anti-HCV antibodies in MR during 2017–2022 ($n = 175$)

Год Year	Выявлено Revealed						Закончили наблюдение на 01.06.2022 The observation was completed on 01.06.2022					
	всего случаев total cases		в том числе впервые выявленных including those identified for the first time		в том числе состояв- ших на учёте ранее including previously registered		естественный клиренс natural clearance		выздоровление после лечения recovery after treatment		по достижении 18 лет* upon reaching the age of 18*	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
2017	7	4,0	3	1,7	4	2,3	1	0,6	3	1,8	1	0,6
2018	25	14,3	7	4,0	18	10,3	3	1,8	8	4,6	1	0,6
2019	50	28,6	22	12,6	28	16,0	13	7,3	14	8,0	4	2,3
2020	21	12,0	12	6,9	9	5,2	4	2,3	7	4,0	2	1,1
2021	31	17,7	15	8,6	16	9,1	4	2,3	10	5,6	1	0,6
2022	41	23,4	6	3,3	35	20,0	7	4,0	1	0,6	–	–
Итого Total	175	100	65	37,1	110	62,9	32	18,3	43	24,6	9	5,2

Примечание. *Все подростки с ХГС, достигшие 18 лет, но не получившие противовирусное лечение.

Note. *All adolescents with CHCV who reached the age of 18, but did not receive any antiviral treatment.

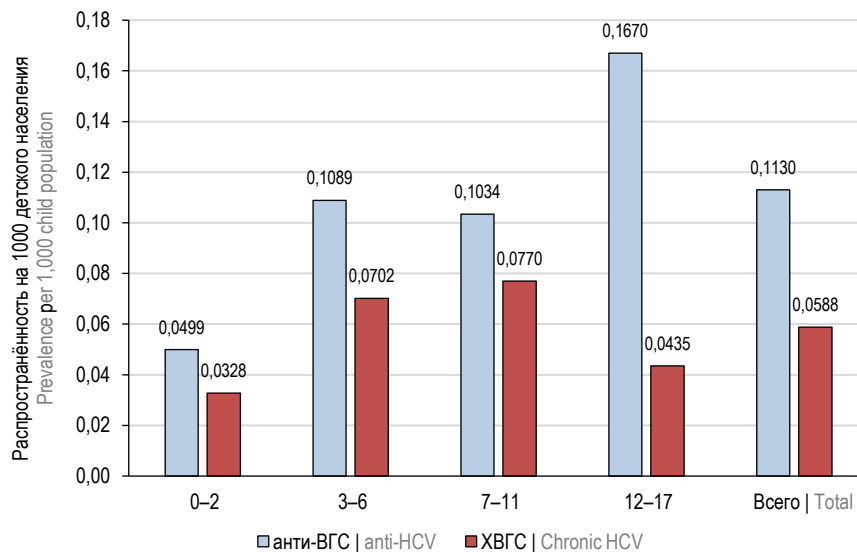


Рис. 1. Возрастная распространённость на 1000 детей соответствующей возрастной группы анти-ВГС (за весь период наблюдения) и ХВГС (на 01.06.2022) в педиатрической популяции МО.

Fig. 1. Age-specific prevalence of anti-HCV (over the entire observation period) and CHCV (as of 1/6/2022) per 1,000 children in the pediatric population of MR.

Эпидемиология ВГС-инфекции среди педиатрической популяции МО

Распространённость инфицированности ВГС (когда-либо по имеющимся данным) детей и подростков в МО составляет не менее 0,113/1000 детского населения; распространённость установленной педиатрической ХВГС в МО на момент публикации статьи — не менее 0,059/1000.

Распространённость как анти-ВГС (инфицированных), так и вирусемической ХВГС у детей в возрасте 3–12 лет почти одинаковая и больше, чем среди детей раннего возраста (**рис. 1**). Инфицированность (когда-либо по имеющимся данным) подростков в 2 раза выше, чем среди детей младших возрастных групп. Однако распространённость ХВГС-инфекции среди подростков на 01.06.2022 существенно ниже в связи с доступностью лечения этой категории пациентов в России и достигнутым показателем охвата лечением.

Для полной эпидемиологической характеристики педиатрической ВГС-инфекции в МО проведён анализ всех выявленных случаев текущей или ранее перенесённой ВГС за 2017–2022 гг. Среди наблюдавшихся пациентов преобладали подростки (**табл. 2**), поскольку лечение ВГС с применением эффективныхПППД было одобрено в России только в 2019 г. Превалировали дети женского пола. Четверть пациентов с ВГС (26,3%) — это дети-сироты и социальные сироты, проживающие в социальных учреждениях или приёмных семьях, причём вдвое чаще с опекунами, чем с усыновителями (**табл. 2**).

Наиболее часто в педиатрической популяции анти-ВГС были выявлены при рутинном тестиро-

вании перед плановой госпитализацией, во время госпитализации по неотложным показаниям (треть случаев) или при обследовании младенцев с перинатальным контактом по ВГС с матерью (треть случаев; **табл. 3**). Доля выявленных при плановом тестировании целевых контингентов была небольшой. Пятая часть (21,9%) детей из 137 с перина-

Таблица 2. Характеристика некоторых демографических и социальных факторов у детей с анти-ВГС в МО ($n = 175$)

Table 2. Some demographic and social factors typical of children with anti-HCV in MR ($n = 175$)

Показатель Indicator	Частота показателей Frequency of indicators		
	n	%	95% ДИ 95% CI
Возраст, лет: Age, years:			
< 3	10	5,7	2,8–10,2
3–7	45	25,7	19,4–32,9
7–12	47	26,9	20,4–34,1
≥ 12	73	41,7	34,3–49,4
Пол: Gender:			
женский female	104	59,4	51,8–66,8
мужской male	71	40,6	33,2–48,2
Воспитанники социальных учреждений Pupils of social institutions	7	4,0	1,6–8,4
Проживание: Accommodation:			
с родителями with parents	129	73,7	66,5–80,1
с опекунами with guardians	26	14,9	9,9–21,0
с усыновителями with adoptive parents	13	7,4	4,0–12,4

Таблица 3. Частота (%) выявления анти-ВГС среди педиатрических контингентов, подлежащих тестированию ($n = 175$)
Table 3. Detection frequency (%) of anti-HCV antibodies among tested pediatric groups ($n = 175$)

Контингенты Contingents	Частота выявления Detection frequency		
	n	%	95% ДИ 95% CI
Рутинное тестирование: Routine testing:			
все население (плановая госпитализация) the entire population (planned hospitalization)	52	29,7	23,1–37,1
в том числе дети, рождённые от матерей с ВГС including children born to mothers with HCV	25	14,3	9,5–20,4
призывники conscripts	2	1,1	0,14–4,10
в том числе дети, рождённые от матерей с ВГС including children born to mothers with HCV	1	0,6	0,01–3,10
при поступлении в учебное заведение upon admission to an educational institution	9	5,1	2,4–9,5
в том числе дети, рождённые от матерей с ВГС including children born to mothers with HCV	1	0,6	0,01–3,10
Уязвимые группы: Vulnerable groups:			
дети, рождённые от матерей с ВГС children born to mothers with HCV	66	37,7	30,5–45,3
в том числе дети, рождённые от матерей с ВГС/ВГВ including children born to mothers with HCV/HBV	1	0,6	0,01–3,10
дети, рождённые от матерей с ВГС/ВИЧ children born to mothers with HCV/HIV	53	30,3	23,6–37,7
опекаемые/усыновлённые дети foster/adopted children*	39	22,3	16,4–29,2
в том числе дети рождённые от матерей с ВГС including children born to mothers with HCV	39	22,3	16,4–29,2
дети без попечения родителей children without parental care	7	4,0	1,6–8,4
в том числе дети, рождённые от матерей с ВГС including children born to mothers with HCV	2	1,1	0,14–4,10
Целевые контингенты: Target contingents:			
пациенты с заболеванием печени patients with liver disease	–	–	–
контактные в очагах ВГС contact in HCV foci	1	0,6	0,01–3,10
реципиенты препаратов крови recipients of blood products	6	3,4	1,3–7,3
онкологические больные oncological diseases	4	2,3	0,63–5,80
в том числе дети, рождённые от матерей с ВГС including children born to mothers with HCV	1	0,6	0,01–3,10
потребители инъекционных наркотиков injecting drug users	1	0,6	0,01–3,10
больные туберкулёзом tuberculosis	3	1,7	0,35–4,90
в том числе дети, рождённые от матерей с ВГС including children born to mothers with HCV	2	1,1	0,14–4,10

Примечание. *Опекаемые/усыновлённые дети были первично обследованы в связи с перинатальным контактом по ВГС.
Note. *Foster/adopted children were initially examined due to their perinatal exposure to HCV.

тальным контактом по ВГС была выявлена поздно, при обследовании по другим показаниям. Отсутствие полных данных о 5 детях, оставшихся без попечения родителей, не позволило установить путь передачи ВГС (табл. 3).

Основной путь заражения детей в МО — перинатальный (табл. 4), причём доля детей с контактом по коинфекции ВИЧ + ВГС составила 30% в структуре путей передачи и была высокой. К другим способам передачи вируса были отнесены инвазивные

Таблица 4. Структура путей передачи ВГС и регион заражения ($n = 175$)
Table 4. Structure of HCV transmission routes and the region of infection ($n = 175$)

Пути передачи Transmission paths	Число случаев Number of cases		
	<i>n</i>	%	95% ДИ 95% CI
Вертикальный: Vertical:	137	78,3	71,4–84,2
в том числе перинатальный контакт с: including perinatal contact with:			
ВГС HCV	82	46,9	39,3–54,5
ВГС + ВИЧ HCV + HIV	53	30,3	23,6–37,7
ВГС + ВГВ HCV + HBV	1	0,6	0,01–3,10
ВГС + туберкулёз HCV + tuberculosis	1	0,6	0,01–3,10
ВГС + сифилис HCV + syphilis	1	0,6	0,01–3,10
Инвазивные медицинские процедуры Invasive medical procedures	7	4,0	1,6–8,4
Переливание препаратов крови Transfusion of blood products	6	3,4	1,3–7,3
Употребление инъекционных наркотиков Injecting drug use	1	0,6	0,01–3,1
Контакт в очаге ВГС Contact in the HCV focus	1	0,6	0,01–3,1
Неизвестный Unknown	23	13,1	8,5–19,1
Регион заражения: The region of infection:			
МО Moscow region	158	90,3	84,9–94,1
другие регионы РФ other regions of the Russian Federation	12	6,9	3,6–11,7
страны ближнего зарубежья neighboring countries	5	2,9	0,93–6,50

медицинские процедуры (оперативные вмешательства, лечение зубов), переливание препаратов крови, употребление инъекционных наркотиков, которые встречались редко. В 1 случае ВГС у ребёнка была выявлена при внутрисемейном контакте с бабушкой, больным ВГС, хотя у других членов тест на анти-ВГС был отрицательным. Помимо матери в 4 (2,3%) семейных очагах ВГС диагностирована также у отца ребёнка, в 1 очаге — у бабушки (во всех этих случаях подтверждён вертикальный путь заражения ребёнка). Путь передачи остался невыясненным в 13% наблюдений. В МО отсутствовали дети, серопозитивные к ВГС, имевшие татуировки или пирсинг.

Ключевой изъяз плановой работы по выявлению ВГС заключался в несвоевременном охвате тестированием детей, рождённых от матерей с ВГС. Согласно форме Федерального статистического наблюдения № 32 «Сведения о медицинской помощи беременным, роженицам и родильницам за период «Годовой. 2021» (форма № 64 утверждена Росстатом от 07.02.2019) в медицинских организациях МО в 2021 г. обследована 66 241 беременная женщина, что составило 92,9% от количества принятых родов в МО (с 22 нед). Из них выявлено 809 (1,2%) беременных, серопозитивных к ВГС. По данным Управления Роспотребнадзора по МО, в том же году обследовано 422 (52%) детей младше 12 мес, рождённых от серопозитивных женщин, а к цен-

трализованной КМП МО прикреплены 44 (10,4%) ребёнка. У 29,5% матерей наблюдаемых младенцев анти-ВГС были впервые выявлены во время беременности.

Почти в 10% случаев местом заражения были другие регионы России (Нижний Новгород, Екатеринбург, Оренбург, Башкортостан, Республика Крым) и страны ближнего зарубежья (Узбекистан, Туркменистан).

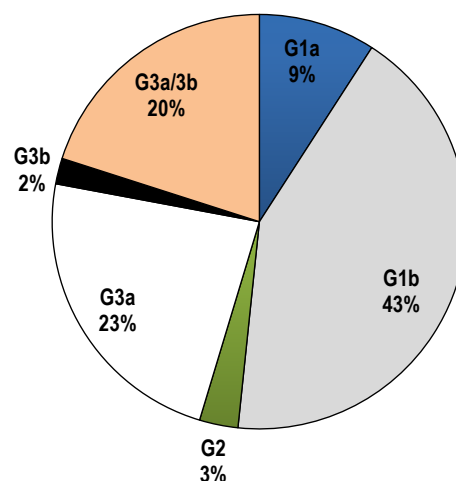


Рис. 2. Структура генотипов ВГС в педиатрической популяции МО ($n = 99$).

Fig. 2. Distribution of HCV genotypes in the pediatric population of MR ($n = 99$).

Генотип ВГС был определён у 99 (56,6%) пациентов. Доминировали G1 (51,5%) и G3 (45,5%) с небольшим преобладанием G1 (рис. 2). Очень редко регистрировался G2. В убывающей последовательности преобладали субтипы G1b, затем G3a и G3a/3b.

Клиническая эпидемиология ВГС-инфекции в педиатрической популяции МО

Из 148 детей с положительным тестом РНК ВГС вирусемическая ХГВС-инфекция была диагностирована у 79 (53,4% [45,0–61,6%]), хроническая болезнь печени, вызванная ВГС, — у 53 (35,8% [28,1–44,1%]), в том числе гепатит средней активности встречался редко (у 5 (5,4%) из 148 пациентов, у остальных — низкой активности). Конъюгационная желтуха присутствовала только у 3 детей с синдромом Жильбера. За 5-летний период у 16 (10,8% [6,3–17,0%]) детей произошёл естественный клиренс вируса.

Эхо-признаки изменений внутренних органов обнаружены у большинства обследованных (65,5%

от числа обследованных), в том числе увеличение размеров печени (12,7%) и селезёнки (10,9%), диффузные изменения паренхимы печени (12,7%) и поджелудочной железы (22,2%), деформация желчного пузыря (32,7%), увеличение мезентериальных лимфатических узлов (1,9%). У 12 (21,8%) пациентов отмечено сочетание признаков.

Определение стадии ФП было проведено в среднем в 8,9 [1–16] года с момента подтверждения вирусемической ХГС. В подавляющем большинстве случаев ФП отсутствовал (по шкале METAVIR F-0, рис. 3), лёгкая степень ФП (F1 и F1–2) встречалась редко (17,8% [9,8–28,5%] случаев). Неблагоприятные последствия ХГС (ФП по шкале METAVIR F1 и F1–2), по имеющимся данным, встречались при инфицировании доминирующими субтипами G1b ($n = 3$), G3a ($n = 2$) и G3a/3b ($n = 2$).

Заболевания, которые трактовались как внепеченочные проявления ВГС-инфекции [16, 17], диагностированы у 2,9% [0,9–6,5%] пациентов (полинейропатия, тиреоидит, ожирение 2-й степени, геморрагический васкулит и иридоциклит), в том

Таблица 5. Структура сопутствующих заболеваний у детей с ВГС в МО ($n = 175$)

Table 5. Distribution of comorbidities in children with HCV in MR ($n = 175$)

Заболевания Diseases	Число случаев Number of cases		
	<i>n</i>	%	95% ДИ 95% CI
Всего Total	70	40,0	32,7–47,7
Болезни органов пищеварения Diseases of the digestive system	25	14,3	9,5–20,4
в том числе: including:			
функциональные расстройства желудочно-кишечного тракта functional disorders of the gastrointestinal tract	10	5,7	2,8–10,3
дисфункция билиарного тракта biliary tract dysfunction	5	2,9	0,93–6,50
хронический гастрит и гастродуоденит chronic gastritis and gastroduodenitis	10	5,7	2,8–10,3
Аллергические заболевания Allergic diseases	14	8,0	4,4–13,1
Болезни нервной системы Diseases of the nervous system	12	6,9	3,6–11,7
Новообразования Neoplasms	4	2,3	0,63–5,8
Болезни эндокринной системы и обмена веществ Diseases of the endocrine system and metabolism	6	3,4	1,3–7,3
в том числе: including:			
сахарный диабет 1-го типа type 1 diabetes mellitus	1	0,6	0,01–3,10
мукополисахаридоз 2-го типа mucopolysaccharidosis type 2	1	0,6	0,01–3,10
синдром Жильбера Gilbert's syndrome	3	1,7	0,35–4,90
гипогликемия неустановленная hypoglycemia unidentified	1	0,6	0,01–3,10
Туберкулёз лёгких Tuberculosis of the lungs	3	1,7	0,35–4,9
Врождённая цитомегаловирусная инфекция Congenital cytomegalovirus infection	2	1,1	0,14–4,1
Врождённые пороки развития Congenital malformations	4	2,3	0,63–5,80
в том числе: including:			
пищевода esophagus	1	0,6	0,01–3,10
сердца hearts	2	1,1	0,14–4,10
расщелина твёрдого и мягкого нёба cleft of hard and soft palate	1	0,6	0,01–3,10

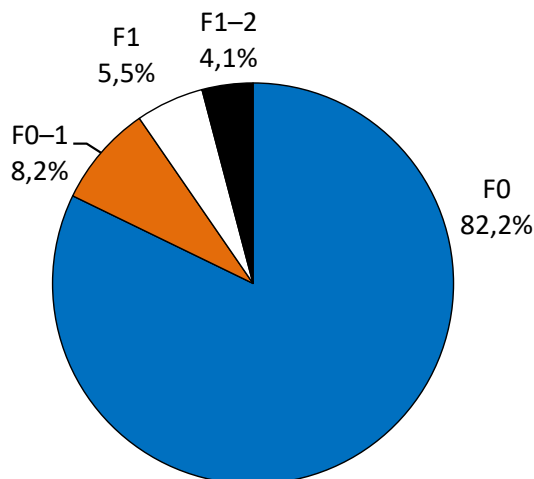


Рис. 3. Стадии ФП по шкале METAVIR в педиатрической популяции ВГС МО ($n = 73$).

Fig. 3. METAVIR scores for LF stages in the pediatric HCV population of MR ($n = 73$).

числе у 3 детей с вертикальным путём заражения ВГС.

Сопутствующие заболевания были определены почти в половине случаев (70–40,0%), в том числе в 8 (10,1%) — сочетание 2 или 3 диагнозов. Преобладали заболевания желудочно-кишечного тракта (**табл. 5**). Аллергические (атопический дерматит — у 7 детей, аллергический ринит — у 5, крапивница на пищевые аллергены в анамнезе — у 2) и неврологические заболевания (задержка психомоторного развития — у 4 детей, детский церебральный паралич, болезнь Дауна, функциональные расстройства вегетативной нервной системы, эпилепсия, аутизм) встречались с одинаковой частотой. Новообразования (острый лимфобластный лейкоз, остеосаркома, нефробластома, опухоль поджелудочной железы) диагностированы у 5,1% пациентов, причём один ребёнок с вертикальным заражением ВГС был оперирован по поводу врождённой нефробластомы. Сахарный диабет 1-го типа и неуточнённая гипогликемия были установлены до инфицирования ВГС. Врождённые пороки развития имели 4 ребёнка, 3 из них с вертикальной передачей ВГС.

При сравнении симптомов и признаков ХГС (болезнь печени) и ХГС-инфекции отмечено, что жалобы на боли в животе, увеличение размеров печени (у получивших ПВТ учтены клинические данные до лечения), увеличение размеров селезёнки и синдром Жильбера встречались только у детей с болезнью печени (**табл. 6**). Однако качественная оценка различий показала отсутствие существенной разницы частоты симптомов и клинических признаков между детьми с вирусической ХГВС, имеющими или не имеющими болезнь печени, за исключением болей в животе. Периодические умеренные боли в животе встречались у пациентов с

болезнью печени чаще на 11,9% [7,0–23,1%]; относительный риск 3,35 [1,09–10,33], сокращение относительного риска 2,35 [0,09–9,35] и ОШ 3,84 [1,12–13,21], чувствительность 69,2%, специфичность 63,0%. По другим признакам доверительный интервал разницы долей содержит ноль и различия не выявлены, хотя обнаружена тенденция к более частому диффузному повреждению печени при активном цитолизе гепатоцитов. Не установлено существенного влияния возраста или генотипа ВГС на течение вирусической ВГС. Частота внепечёночных проявлений ХГС также не зависела от активности воспалительной реакции в печени.

Обсуждение

Впервые обобщены клинико-эпидемиологические данные, позволяющие более точно охарактеризовать педиатрическую ВГС-инфекцию в МО. Одной из возможных причин неоптимальной или низкой частоты диагностики ВГС у детей и подростков является тот факт, что до 2017 г. не существовало одобренного лечения для детей младше 18 лет, лишь в немногих странах существуют рекомендации по систематическому тестированию и лечению подростков [2, 8].

В России когорты, подлежащие тестированию, чётко определены и, тем не менее, актуальная и объективная информация в различных регионах крайне необходима.

На глобальном уровне бремя ВГС-инфекции среди детей и подростков может составлять 0,15% [4]. В России распространённость ВГС-инфекции среди детей изучена недостаточно. Предполагается, что она может составлять в возрасте 1–14 и 15–19 лет 14 и 80 на 100 тыс. детского населения соответственно [5] или несколько ниже [6]. По опубликованным ранее данным, частота серопозитивных проб среди детей в МО достигает 0,4–2,1% в зависимости от возраста [18]. Собственные результаты свидетельствуют о более низких показателях — 5,88 на 100 тыс. (0,0588%) по сравнению с прогнозом G. Indolfi и соавт. [4] или С. Мукомолова и соавт. [5] или превышают данные, собранные по сведениям статистического наблюдения в России [6]. Суммарная распространённость инфицированных ранее или в настоящее время в МО сопоставима с прогнозируемой — 11,3 на 100 тыс. (0,113%). В работе Н.В. Соболевой и соавт., обнаруживших высокую распространённость анти-ВГС в МО [18], не исключён риск смещения результатов, связанного с методологией сбора биологических образцов для исследования. Более низкие показатели распространённости инфекции в сравнении с прогнозируемыми, возможно, обусловлены снижением общей заболеваемости в последние годы в России, колебаниями показателя в различных регионах [6], а также началом активного лечения подростков с применением ПППД.

Таблица 6. Характеристика ХГС (болезнь печени) и ХГС-инфекции
Table 6. Characteristics of CHC (liver disease) and CHCV infection

Симптомы и признаки Symptoms and signs	ХГС Chronic hepatitis C (n = 53)		ХГС-инфекция Chronic hepatitis C virus infection (n = 79)		p χ ²
	n	%	n	%	
Возраст, лет: Age, years:					0,119 df = 3
< 3	4	7,5	4	5,1	
3–7	18	34,0	15	19,0	
7–12	10	18,9	27	34,2	
≥ 12	21	39,6	33	41,8	
Боли в животе Abdominal pain	9	17,0	4	5,1	0,024
Утомляемость Fatigue	1	1,9	–	–	–
Увеличение размеров печени An increase in the size of the liver	7	13,2	3	3,8	0,045
Увеличение размеров селезёнки Increase in the size of the spleen	4	7,5	–	–	–
Внепечёночные проявления ВГС Extrahepatic manifestations of HCV	3	5,7	2	2,5	0,356
Болезни органов пищеварения Diseases of the digestive system	9	17,0	10	12,7	0,488
Синдром Жильбера Gilbert 's syndrome	3	5,7	–	–	–
Стадия фиброза по шкале METAVIR F1–2 The stage of fibrosis according to the METAVIR scale F1–2	5	17,2	2	5,4	0,122
Эхо-признаки изменений со стороны органов брюшной полости Ultrasonography signs of changes from the abdominal organs	16	80,0	11	55,0	0,092
в том числе: including:					
увеличение размеров печени an increase in the size of the liver	3	15	2	10	0,633
увеличение размеров селезёнки an increase in the size of the spleen	4	20	1	2	0,152
диффузные изменения печени diffuse changes in the liver	5	25	1	2	0,077
диффузные изменения поджелудочной железы diffuse changes in the pancreas	5	25	4	20	0,705
деформация желчного пузыря deformation of the gallbladder	5	25	10	50	0,103
G1a	3	7,1	5	10	p > 0,05 df = 5
G1b	19	45,2	19	38	
G2	2	4,8	1	2	
G3a	9	21,4	14	28	
G3b	1	2,4	1	2	
G3a/3b	8	19,0	10	20	

Примечание. Распределение степени ФП приведено для n = 29 и n = 37, эхо-признаков изменений органов брюшной полости — для n = 20 и n = 20 и генотипов ВГС — для n = 42 и n = 50 в сравниваемых группах соответственно, пациенты с естественным клиренсом вируса в таблице не учтены.

Note. Distribution of LF stages is given for n = 29 and n = 37; ultrasonography signs of changes in abdominal organs — for n = 20 and n = 20; HCV genotypes — for n = 42 and n = 50 in the compared groups, respectively; patients with natural virus clearance are not included in the table.

Действительно, распространённость ВГС-инфекции с возрастом увеличивается [19], и более высокая заболеваемость подростков отмечается повсеместно [6, 8, 11]. Подростки преобладали в наблюдаемой нами когорте (41,7% [34,3–49,4%]), но к моменту публикации результатов настоящего исследования распространённость вирусической ВГС среди подростков (0,0435%) была существенно ниже, чем среди детей 3–6 или 7–11 лет (0,070–0,077% соответственно), что было обусловлено применением ПВТ.

Наиболее часто анти-ВГС были выявлены при рутинном скрининговом тестировании или обследовании детей, рождённых от матерей с ВГС. Однако у 21,9% детей с перинатальным контактом по ВГС вирусическая инфекция была выявлена поздно, при обследовании по другим показаниям.

В МО в структуре путей передачи ВГС преобладает вертикальный — 78,3% [71,4–84,2%] случаев, что выше опубликованных российских данных [5, 7, 11] и приближается к европейским показателям (90%) [20]. Ключевым изъяном неоптимальной

верификации ВГС-инфекции у детей в МО может быть неполный или несвоевременный охват тестированием детей, рождённых от инфицированных матерей, в том числе из-за недостаточности представленных пациентами данных. В качестве одного из путей решения проблемы следует рассмотреть укрепление преемственности между медицинскими организациями. Ещё одной выявленной проблемой организации медицинской помощи для выявления ВГС является нередкое отсутствие каких-либо клинико-эпидемиологических сведений, позволяющих оценить пути передачи инфекции у детей, оставшихся без попечения родителей. Плановое обследование детей из неблагополучных семей не предусмотрено нормативными актами России. Необходимы дополнительные исследования, чтобы оценить эффективность их рутинного тестирования, хотя имеются объективные трудности проведения такой работы. Несмотря на то, что частота предполагаемого пути передачи ВГС при проведении медицинских манипуляций была небольшой, тем не менее обнаружение ВГС-инфекции у каждого онкологического пациента или реципиента препаратов крови имеет не только клиническое, но и социальное значение. Мы не выявили практики татуировок или пирсинга среди подростков МО, вероятно, плановое тестирование этой педиатрической категории в МО на текущий момент не так актуально, как в Европе [4].

Следовательно, в качестве ограничений исследования можно рассматривать вероятно существующий резерв выявления ВГС-инфекции у детей и подростков МО. Необходимо продолжить исследование в этом направлении.

Из 164 детей, тестированных с определением РНК ВГС за пятилетний период, текущая вирусемическая ВГС была подтверждена у 90,2% [84,6–94,3%]. Из них ХГВС-инфекция диагностирована у половины и хроническая болезнь печени, вызванная ВГС, — более чем у трети пациентов, как правило, с лёгким течением, что несколько реже опубликованных российских данных [7]. При естественном течении болезнь печени медленно прогрессирует к подростковому возрасту, и четверть пациентов, прошедших или начавших лечение, имеют различные степени ФП, что определяется длительностью инфекции [21]. Однако нами не выявлено отчётливой возрастной зависимости частоты болезни печени или стадии ФП, хотя ни у одного ребёнка младше 7 лет ФП не был подтверждён. Вероятно, редкое обнаружение ФП в обследованной популяции повлияло на результат. Полученные данные можно считать достаточно надёжными, поскольку использованные методы диагностики убедительны для исключения тяжёлого ФП [15]. Суммарно (до начала наблюдения и в его процессе) естественный клиренс вируса отмечен у 19,5% [13,8–26,4%]) детей. Его частота была сопоставима с международными показателя-

ми [22, 23]. Распределение генотипов в структуре ВГС в МО также было аналогичным ранее опубликованным данным, существенно преобладал субтип G1b, хотя G3 встречался достаточно часто [6, 7, 11]. Внепечёночные проявления в МО, как и повсеместно [23], были диагностированы редко.

При относительно лёгком течении ВГС-инфекции в педиатрической популяции необходимо отметить весомый социальный аспект проблемы. Четверть наблюдавшихся были опекаемыми/усыновлёнными или остались без попечения родителей, треть родилась от матерей с коинфекцией (ВИЧ/туберкулёз/сифилис), 15,4% имели значимую коморбидность (онкологические болезни, болезни эндокринной системы и обмена веществ, в том числе генетически обусловленные, врождённые пороки развития, врождённую цитомегаловирусную инфекцию, туберкулёз). Кроме того, ВГС-инфекция связывается со стигмой в педиатрии [4].

Поэтому вопрос адекватного выявления ВГС и раннего начала лечения приобретает не только медицинское, но и важное социальное значение. В настоящее время лечение ВГС-инфекции рекомендовано вне зависимости от активности цитолиза гепатоцитов. Однако на местном уровне рекомендации по универсальному лечению подростков с инфекцией ВГС отстают³. Только в 20 из 122 стран, поддерживающих национальную политику в отношении лечения ВГС пангенотипными схемами ПППД, уделено внимание подросткам [25]. Пангенотипные схемы ПВТ недавно были лицензированы в России [11]. По опубликованным данным, в США только 1,6% детей с подтверждённым ХГС получали лечение [25]. До недавнего времени около 30–40% европейских детей имеют доступ к лечению [4].

Охват лечением подлежащей когорты (71,2%) в МО за пятилетний период позволил вдвое снизить распространённость ВГС-инфекции среди подростков МО в сравнении с детьми другого возраста.

Сильной стороной работы является её существенное медико-социальное практическое значение для МО, поскольку она направлена на решение актуальнейших задач по обеспечению доступности медицинской помощи и достижение перспективной цели — элиминации ВГС среди детей в МО. В целом на репрезентативной выборке установлены основные характеристики инфекции ВГС у детей и подростков. Значительно улучшилось качество оказания медицинской помощи детям с ВГС.

Выводы

1. В рамках КМП МО детям с ВГС-инфекцией охват тестированием составил 93,7%, а лечением в

³ WHO. Guidelines for the care and treatment of persons diagnosed with chronic hepatitis C virus infection. Geneva; 2018. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531733>

подлежащей когорте (подростки старше 12 лет) — 71,2%, что выше опубликованных международных показателей.

2. Распространённость серопозитивности к ВГС в педиатрической популяции МО оценивается как не менее 0,113 на 1000 детей, установленной ХГС — не менее 0,059. Доминировали с убывающей частотой субтипы G1b (43,4% [33,5–53,8%]), G3a (23,2% [15,3–32,8%]) и G3a/3b (20,2% [12,8–29,5%]).

3. Заболеваемость ХГС-инфекцией на 100 тыс. детей соответствующего возраста в МО на 01.06.2022 составляет 3,3 у детей младше 3 лет; 7,0 — у детей 3–6 лет; 7,7 — у детей 7–11 лет, 4,4 — у подростков старше 12 лет.

3. Виремическая ВГС подтверждена у 90,2% [84,6–94,3%] обследованных, в том числе ХГВС-инфекция — у 53,4% [45,0–61,6%], хроническая болезнь печени, вызванная ВГС, — у 35,8% [28,1–44,1%], в подавляющем большинстве с низкой степенью активности и редкими последствиями при инфицировании доминирующими генотипами (ФП по шкале METAVIR F1 и F1–2 — у 17,2% [9,8–28,5%]). Не установлено существенных клинико-эпидемиологических отличий между естественным течением ХГС-инфекции и болезни печени.

4. Частота естественного клиренса ВГС (в момент обращения или при динамическом наблюдении) составила 19,5% [13,8–26,4%].

5. Внепечёночные проявления ВГС-инфекции диагностированы с частотой 2,9% [0,9–6,5%].

6. Предварительные данные свидетельствуют о возможности снижения распространения ХГС-инфекции за счёт высокого охвата лечением (71,2%). Несмотря на преобладание подростков в когорте инфицированных (41,7% [34,3–49,4%]), распространённость виремической ВГС в этом возрасте в 2021–2022 гг. (0,0435%) была существенно ниже, чем среди детей 3–6 или 7–11 лет (0,070–0,077% соответственно), что было обусловлено применением ПВТ.

7. Бремя педиатрической ВГС-инфекции в МО утяжелено значительной долей социально уязвимых и коморбидных пациентов.

8. Основной путь передачи ВГС — вертикальный (у 78,3% [71,4–84,2%] пациентов), предполагаемое заражение при медицинских инвазивных процедурах — у 7,4% [4,0–12,4%], при употреблении наркотических средств — у 0,6% [0,01–3,10%], при контакте в семейном очаге ВГС — у 0,6% [0,01–3,10%].

9. Новые случаи ВГС-инфекции выявлялись чаще всего при рутинном обследовании перед госпитализацией или при обследовании детей с перинатальным контактом по ВГС.

10. Резервом для оптимального выявления новых случаев ВГС-инфекции следует рассматривать

мероприятия, направленные на укрепление преемственности между медицинскими организациями и раннее лечение женщин детородного возраста. Необходимы дополнительные исследования, чтобы оценить эффективность рутинного тестирования всех социально уязвимых групп детей.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Lazarus J.V., Wiktor S., Colombo M., Thursz M.; EASL International Liver Foundation. Micro-elimination — A path to global elimination of hepatitis C. *J. Hepatol.* 2017; 67(4): 665–6. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.06.033>.
2. Indolfi G., Bailey H., Serranti D., Giaquinto C., Thorne C.; PENTA Hep Study Group. Treatment and monitoring of children with chronic hepatitis C in the Pre-DAA era: A European survey of 38 paediatric specialists. *J. Viral. Hepat.* 2019; 26(8): 961–8. <https://doi.org/10.1111/jvh.13111>
3. Schmelzer J., Dugan E., Blach S., Coleman S., Cai Z., DePaola M., et al. Global prevalence of hepatitis C virus in children in 2018: a modelling study. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 2020; 5(4): 374–92. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(19\)30385-1](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(19)30385-1)
4. Indolfi G., Easterbrook P., Dusheiko G., El-Sayed M.H., Jonas M.M., Thorne C., et al. Hepatitis C virus infection in children and adolescents. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 2019; 4(6): 477–87. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(19\)30046-9](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(19)30046-9)
5. Mukomolov S., Trifonova G., Levakova I., Bolsun D., Krivanogova E. Hepatitis C in the Russian Federation: challenges and future directions. *Hepat. Med.* 2016; 8: 51–60. <https://doi.org/10.2147/HMER.S50172>
6. Пименов Н.Н., Комарова С.В., Карандашова И.В., Цапкова Н.Н., Волчкова Е.В., Чуланов В.П. Гепатит С и его исходы в России: анализ заболеваемости распространённости и смертности до начала программы элиминации инфекции. *Инфекционные болезни.* 2018; 16(3): 37–45. <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2018-3-37-45>
7. Turkova A., Volynets G.V., Crichton S., Skvortsova T.A., Panfilova V.N., Rogozina N.V., et al. Advanced liver disease in Russian children and adolescents with chronic hepatitis C. *J. Viral. Hepat.* 2019; 26(7): 881–92. <https://doi.org/10.1111/jvh.13093>
8. Mari P.C., Gulati R., Fragassi P. Adolescent hepatitis C: Prevalence, impact, and management challenges. *Adolesc. Health Med. Ther.* 2021; 12: 45–53. <https://doi.org/10.2147/AHMT.S263864>
9. Epstein R.L., Wang J., Hagan L., Mayer K.H., Puro J., Linas B.P., et al. Hepatitis C virus antibody testing among 13- to 21-year-olds in a large sample of US Federally Qualified Health Centers. *JAMA.* 2019; 322(22): 2245–8. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.16196>
10. Кравченко И.Э., Гинятуллин Р.Р., Амон Е.П., Малинникова Е.Ю. Состояние медицинской помощи больным хроническим гепатитом С в Российской Федерации. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение.* 2019; 8(4): 48–57. <https://doi.org/10.24411/2305-3496-2019-14007>
11. Malik F., Chulanov V., Pimenov N., Fomicheva A., Lundin R., Levina N., et al. Treatment and monitoring of children and adolescents with hepatitis C in Russia: Results from a multi-centre survey on policy and practice. *J. Virus. Erad.* 2022; 8(1): 100063. <https://doi.org/10.1016/j.jve.2022.100063>
12. Санитарные правила и нормы СанПиН 3.3686-21. Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней. М.; 2021.
13. Nobili V., Monti L., Alisi A., Lo Zupone C., Pietrobattista A., Toma P. Transient elastography for assessment of fibrosis in

- paediatric liver disease. *Pediatr. Radiol.* 2011; 41(10): 1232–8. <https://doi.org/10.1007/s00247-011-2143-y>
14. Nobili V., Vizzutti F., Arena U., Abraldes J.G., Marra F., Pirotto Battista A., et al. Accuracy and reproducibility of transient elastography for the diagnosis of fibrosis in pediatric nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2008; 48(2): 442–8. <https://doi.org/10.1002/hep.22376>
 15. European Association for the Study of the Liver; Clinical Practice Guidelines Panel: Chair; EASL Governing Board representative; Panel members. EASL recommendations on treatment of hepatitis C: Final update of the series. *J. Hepatol.* 2020; 73(5): 1170–218. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.08.018>
 16. Байкова Т.А., Лопаткина Т.Н. Многообразие внепеченочных проявлений хронических вирусных гепатитов В и С, общие принципы лечения. *Терапевтический архив.* 2013; 85(4): 106–10.
 17. Рогозина Н.В., Горячева Л.Г., Шилова И.В., Луцкий А.А., Железникова Г.Ф., Лапин С.В. Течение хронического гепатита С и распространенность внепеченочных проявлений у детей. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы.* 2012; (5): 34–9.
 18. Соболева Н.В., Карлсен А.А., Кожанова Т.В., Кичатова В.С., Клушкина В.В., Исаева О.В. и др. Распространенность вируса гепатита С среди условно здорового населения Российской Федерации. *Журнал инфектологии.* 2017; 9(2): 56–64. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2017-9-2-56-64>
 19. Beech V.M., Myers L., Beech D.J. Hepatitis B and C infections among homeless adolescents. *Fam. Community Health.* 2002; 25(2): 28–36. <https://doi.org/10.1097/00003727-200207000-000057>
 20. Benova L., Mohamoud Y.A., Calvert C., Abu-Raddad L.J. Vertical transmission of hepatitis C virus: systematic review and meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* 2014; 59(6): 765–73. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu447>
 21. European Paediatric HIV/HCV Co-infection Study Group in the European Pregnancy and Paediatric HIV Cohort Collaboration (EPPICC) in EuroCoord. Coinfection with HIV and hepatitis C virus in 229 children and young adults living in Europe. *AIDS.* 2017; 31(1): 127–35. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001285>
 22. Stinco M., Bartolini E., Veronese P., Rubino C., Moriondo M., Ricci S., et al. Epidemiology and natural history of childhood-acquired chronic hepatitis C: A single-center long-term prospective study. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2022; 75(2): e2–7. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000003481>
 23. Tovo P.A., Calitri C., Scolfaro C., Gabiano C., Garazzino S. Vertically acquired hepatitis C virus infection: Correlates of transmission and disease progression. *World J. Gastroenterol.* 2016; 22(4): 1382–92. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i4.1382>
 24. Malik F., Bailey H., Chan P., Collins I.J., Mozalevskis A., Thorne C., et al. Where are the children in national hepatitis C policies? A global review of national strategic plans and guidelines. *JHEP Rep.* 2021; 3(2): 100227. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2021.100227>
 25. Delgado-Borrego A., Smith L., Jonas M.M., Hall C.A., Negre B., Jordan S.H., et al. Expected and actual case ascertainment and treatment rates for children infected with hepatitis C in Florida and the United States: epidemiologic evidence from statewide and nationwide surveys. *J. Pediatr.* 2012; 161(5): 915–21. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2012.05.002>
 - bal elimination of hepatitis C. *J. Hepatol.* 2017; 67(4): 665–6. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.06.033>
 3. Indolfi G., Bailey H., Serranti D., Giaquinto C., Thorne C.; PENTA Hep Study Group. Treatment and monitoring of children with chronic hepatitis C in the Pre-DAA era: A European survey of 38 paediatric specialists. *J. Viral. Hepat.* 2019; 26(8): 961–8. <https://doi.org/10.1111/jvh.13111>
 4. Schmelzer J., Dugan E., Blach S., Coleman S., Cai Z., DePaola M., et al. Global prevalence of hepatitis C virus in children in 2018: a modelling study. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 2020; 5(4): 374–92. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(19\)30385-1](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(19)30385-1)
 5. Indolfi G., Easterbrook P., Dusheiko G., El-Sayed M.H., Jonas M.M., Thorne C., et al. Hepatitis C virus infection in children and adolescents. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 2019; 4(6): 477–87. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(19\)30046-9](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(19)30046-9)
 6. Mukomolov S., Trifonova G., Levakova I., Bolsun D., Krivanogova E. Hepatitis C in the Russian Federation: challenges and future directions. *Hepat. Med.* 2016; 8: 51–60. <https://doi.org/10.2147/HMER.S50172>
 7. Pimenov N.N., Komarova S.V., Karandashova I.V., Tsapkova N.N., Volchkova E.V., Chulanov V.P. Hepatitis C and its outcomes in Russia: analysis of incidence, prevalence and mortality rates before the start of the programme of infection elimination. *Infektsionnye bolezni.* 2018; 16(3): 37–45. <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2018-3-37-45> (in Russian)
 8. Turkova A., Volynets G.V., Crichton S., Skvortsova T.A., Panfilova V.N., Rogozina N.V., et al. Advanced liver disease in Russian children and adolescents with chronic hepatitis C. *J. Viral. Hepat.* 2019; 26(7): 881–92. <https://doi.org/10.1111/jvh.13093>
 9. Mari P.C., Gulati R., Fragassi P. Adolescent hepatitis C: Prevalence, impact, and management challenges. *Adolesc. Health Med. Ther.* 2021; 12: 45–53. <https://doi.org/10.2147/AHMT.S263864>
 10. Epstein R.L., Wang J., Hagan L., Mayer K.H., Puro J., Linas B.P., et al. Hepatitis C virus antibody testing among 13- to 21-year-olds in a large sample of US Federally Qualified Health Centers. *JAMA.* 2019; 322(22): 2245–8. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.16196>
 11. Kravchenko I.E., Ginyatullin R.R., Amon E.P., Malinnikova E.Yu. Status of medical care for patients with chronic hepatitis C in the Russian Federation. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie.* 2019; 8(4): 48–57. <https://doi.org/10.24411/2305-3496-2019-14007> (in Russian)
 12. Malik F., Chulanov V., Pimenov N., Fomicheva A., Lundin R., Levina N., et al. Treatment and monitoring of children and adolescents with hepatitis C in Russia: Results from a multi-centre survey on policy and practice. *J. Virus. Erad.* 2022; 8(1): 100063. <https://doi.org/10.1016/j.jve.2022.100063>
 13. Sanitary rules and norms SanPiN 3.3686—21. Sanitary and epidemiological requirements for the prevention of infectious diseases. Moscow; 2021. (in Russian)
 14. Nobili V., Monti L., Alisi A., Lo Zupone C., Pirotto Battista A., Toma P. Transient elastography for assessment of fibrosis in paediatric liver disease. *Pediatr. Radiol.* 2011; 41(10): 1232–8. <https://doi.org/10.1007/s00247-011-2143-y>
 15. Nobili V., Vizzutti F., Arena U., Abraldes J.G., Marra F., Pirotto Battista A., et al. Accuracy and reproducibility of transient elastography for the diagnosis of fibrosis in pediatric nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2008; 48(2): 442–8. <https://doi.org/10.1002/hep.22376>
 16. European Association for the Study of the Liver; Clinical Practice Guidelines Panel: Chair; EASL Governing Board representative; Panel members. EASL recommendations on treatment of hepatitis C: Final update of the series. *J. Hepatol.* 2020; 73(5): 1170–218. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.08.018>
 17. WHO Monitoring and evaluation for viral hepatitis B and C: recommended indicators and framework. Technical report.

REFERENCES

1. WHO. Global health sector strategy on viral hepatitis 2016–2021. Towards ending viral hepatitis; 2016. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/246177>
2. Lazarus J.V., Wiktor S., Colombo M., Thursz M.; EASL International Liver Foundation. Micro-elimination — A path to glo-

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Geneva; 2016. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204790/1/9789241510288_eng.pdf
18. Baykova T.A., Lopatkina T.N. A variety of extrahepatic manifestations of chronic viral hepatitis B and C: basic treatment principles. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2013; 85(4): 106–10. (in Russian)
 19. Rogozina N.V., Goryacheva L.G., Shilova I.V., Lutskiy A.A., Zheleznikova G.F., Lapin S.V. The course of chronic hepatitis C and the prevalence of extrahepatic manifestations in children. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktual'nye voprosy*. 2012; (5): 34–9. (in Russian)
 20. Soboleva N.V., Karlsen A.A., Kozhanova T.V., Kichatova V.S., Klushkina V.V., Isaeva O.V., et al. The prevalence of the hepatitis C virus among the conditionally healthy population of the Russian Federation. *Zhurnal infektologii*. 2017; 9(2): 56–64. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2017-9-2-56-64> (in Russian)
 21. Beech B.M., Myers L., Beech D.J. Hepatitis B and C infections among homeless adolescents. *Fam. Community Health*. 2002; 25(2): 28–36. <https://doi.org/10.1097/00003727-200207000-000057>
 22. Benova L., Mohamoud Y.A., Calvert C., Abu-Raddad L.J. Vertical transmission of hepatitis C virus: systematic review and meta-analysis. *Clin. Infect. Dis*. 2014; 59(6): 765–73. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu447>
 23. European Paediatric HIV/HCV Co-infection Study Group in the European Pregnancy and Paediatric HIV Cohort Collaboration (EPPICC) in EuroCoord. Coinfection with HIV and hepatitis C virus in 229 children and young adults living in Europe. *AIDS*. 2017; 31(1): 127–35. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001285>
 24. Stinco M., Bartolini E., Veronese P., Rubino C., Moriondo M., Ricci S., et al. Epidemiology and natural history of childhood-acquired chronic hepatitis C: A single-center long-term prospective study. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr*. 2022; 75(2): e2–7. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000003481>
 25. Tovo P.A., Calitri C., Scolfaro C., Gabiano C., Garazzino S. Vertically acquired hepatitis C virus infection: Correlates of transmission and disease progression. *World J. Gastroenterol*. 2016; 22(4): 1382–92. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i4.1382>
 26. WHO. Guidelines for the care and treatment of persons diagnosed with chronic hepatitis C virus infection. Geneva; 2018. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531733/>
 27. Malik F., Bailey H., Chan P., Collins I.J., Mozalevskis A., Thorne C., et al. Where are the children in national hepatitis C policies? A global review of national strategic plans and guidelines. *JHEP Rep*. 2021; 3(2): 100227. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2021.100227>
 28. Delgado-Borrego A., Smith L., Jonas M.M., Hall C.A., Negré B., Jordan S.H., et al. Expected and actual case ascertainment and treatment rates for children infected with hepatitis C in Florida and the United States: epidemiologic evidence from statewide and nationwide surveys. *J. Pediatr*. 2012; 161(5): 915–21. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2012.05.002>

Информация об авторах

Мескина Елена Руслановна[✉] — д.м.н., зав. отд. детских инфекций отдела терапии МОНКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия, meskinaelena@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1960-6868>

Галкина Лидия Алексеевна — к.м.н., с.н.с. отд. детских инфекций МОНКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0052-2867>

Целипанова Елена Евгеньевна — к.м.н., с.н.с. отд. детских инфекций МОНКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0586-8402>

Одинаева Нурино Джумаевна — д.м.н., профессор кафедры педиатрии МОНКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия; директор Научно-исследовательского клинического института детства, Мытищи, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5214-8072>

Участие авторов. Мескина Е.Р. — концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация полученных данных, редактирование текста; Галкина Л.А. — набор клинического материала, формирование групп пациентов, создание базы данных, анализ результатов, статистическая обработка данных, написание текста; Целипанова Е.Е. — набор клинического материала, статистический анализ результатов; Одинаева Н.Д. — интерпретация полученных данных. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 22.08.2022;
принята к публикации 26.10.2022;
опубликована 30.10.2022

Information about the authors

Elena R. Meskina[✉] — D. Sci. (Med.), Head, Children's infectious disease department, M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russia, meskinaelena@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1960-6868>

Lidiya A. Galkina — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Children's infectious disease department, M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0052-2867>

Tselipanova Elena Evgenyevna — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Children's infectious disease department, M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0586-8402>

Nuriniso D. Odinaeva — D. Sci. (Med.), Professor, Chair of pediatrics, M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russia; Director, Research Clinical Institute of Childhood, Mytishchi, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5214-8072>

Author contribution. Meskina E.R. — concept and design of the study, analysis and interpretation of the data obtained, text editing; Galkina L.A. — a set of clinical material, the formation of groups of patients, the creation of a database, analysis of the results, statistical data processing, writing a text; Tselipanova E.E. — a set of clinical material, statistical analysis of the results; Odinaeva N.D. — interpretation of the received data. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 22.08.2022;
accepted for publication 26.10.2022;
published 30.10.2022

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-287>

Компетентность комаров *Culex pipiens f. molestus* как переносчиков вируса Западного Нила при различных температурных условиях

Молчанова Е.В.[✉], Лучинин Д.Н., Мачнева А.Ю., Герасимова А.Д.,
Несговорова А.В., Бородай Н.В., Плеханова Н.Г., Батулин А.А.

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт, Волгоград, Россия

Аннотация

Введение. Комары *Culex pipiens* являются одним из компетентных видов переносчиков вируса Западного Нила (ВЗН). *Culex pipiens f. molestus* (*Cx. p. f. molestus*) — синантропная, автогенная, широко распространённая форма вида, способная питаться на широком круге хозяев, в том числе на человеке. Температура среды обитания насекомых влияет на потенциал вирусофорности, чем определяет их компетентность как переносчиков возбудителя лихорадки Западного Нила (ЛЗН).

Цель — экспериментальное изучение влияния температуры среды обитания личинок на компетентность комаров *Cx. p. f. molestus* как переносчиков ВЗН.

Материалы и методы. В работе использовали штамм ВЗН (WNV_Volg601/18 2 генотипа) и лабораторную культуру комаров *Cx. p. f. molestus*. Концентрацию вирусного изолята определяли методом бляшкообразования с помощью культуры клеток Vero. Заражение насекомых проводили перорально на личиночной стадии с последующей инкубацией на протяжении всего цикла при 20, 22 или 28°C. Через 72 ч после вылета всех имаго из куколок комаров обездвигивали на холоде, определяли пол, выделяли у самок слюнные железы, исследовали их на наличие ВЗН и определяли его титр.

Результаты. В результате исследования установлено, что ВЗН в титре, достаточном для передачи патогена при кровососании, был обнаружен в слюнных железах насекомых, развивающихся при температуре 22 и 28°C, при этом его концентрация повышалась с увеличением температуры среды. В слюнных железах самок насекомых, развивающихся при температуре 20°C, вирус не выявлен.

Заключение. Температура среды обитания является одним из ключевых факторов, ограничивающих репликацию и концентрацию ВЗН в слюнных железах комаров *Cx. p. f. molestus*.

Ключевые слова: вирус Западного Нила, *Culex pipiens*, С6/36, компетентность

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: Молчанова Е.В., Лучинин Д.Н., Мачнева А.Ю., Герасимова А.Д., Несговорова А.В., Бородай Н.В., Плеханова Н.Г., Батулин А.А. Компетентность комаров *Culex pipiens f. molestus* как переносчиков вируса Западного Нила при различных температурных условиях. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(5):540–544.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-287>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-287>

Competence of mosquitoes *Culex pipiens f. molestus* as carriers of West Nile virus under various temperature conditions

Elena V. Molchanova[✉], Dmitry N. Luchinin, Anastasiya Yu. Machneva, Arina D. Gerasimova,
Anna V. Nesgovorova, Natalya V. Boroday, Natalya G. Plekhanova, Artem A. Baturin

Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russia

Annotation

Introduction. The *Culex pipiens* mosquito is one of the proven vectors of the West Nile virus (WNV). *Culex pipiens f. molestus* (*Cx. p. f. molestus*) is a synanthropic, autogenous, widespread form of the species that can feed on a broad range of hosts, including humans. The temperature of the habitat of insects affects the potential for virus transmission, which determines the likelihood of them carrying the pathogen of West Nile fever.

The goal is an experimental study of the temperature of the habitat of larvae on the competence of mosquitoes *Cx. p. f. molestus* as carriers of WNV.

Materials and methods. We used a strain of the WNV (WNV_Volg601/18 genotype 2) and a laboratory culture of mosquitoes *Cx. p. f. molestus*. The concentration of the virus was detected by plaque formation using Vero cells. Insects were infected orally at the larval stage, with subsequent incubation at 20, 22 or 28°C. 72 hours after the emergence of all adults from the pupae, the mosquitoes were immobilized by cold, the sex of imago was determined, the salivary glands were isolated from the females, and the presence of WNV in glands and its titer were detected.

Results. The titer of WNV sufficient to transmit the pathogen through the insect biting was observed in the salivary glands of insects kept at a temperature of 22 and 28°C, with the virus titer rising with the temperature increasing. No virus was detected in the salivary glands of female insects kept at a temperature of 20°C.

Conclusion. Thus, it appears that the habitat temperature is an important factor limiting the replication and content of WNV in the salivary glands of *Cx. p. f. molestus*.

Keywords: West Nile virus, *Culex pipiens f. molestus*, C6/36, competence

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: Molchanova E.V., Luchinin D.N., Machneva A.Yu., Gerasimova A.D., Nesgovorova A.V., Boroday N.V., Plekhanova N.G., Baturin A.A. Competence of mosquitoes *Culex pipiens f. molestus* as carriers of West Nile virus under various temperature conditions. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(5):540–544.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-287>

Введение

Вид комаров *Culex pipiens* (Diptera, Culicidae) состоит из 2 морфологически идентичных биотипов: *pipiens* (Linnaeus, 1758) и *molestus* (Forskål, 1775), различающихся по физиологии и поведению [1].

В Европе *Culex pipiens f. molestus* (*Cx. p. f. molestus*) впервые появился в 1920-х гг. Приспособленность *Cx. p. f. molestus* к существованию в условиях городского жилища привела к расширению ареала его обитания на север. В 1960-х гг. комары заселили города европейского Севера. С 1980-х гг. началось проникновение этих насекомых в Сибирь и на Дальний Восток [2]. Наличие *Cx. p. f. molestus* отмечено практически во всех населённых пунктах России умеренной зоны [3]. Широкое распространение данного вида обусловлено его высокой экологической пластичностью, способностью личинок развиваться в разнообразных естественных и искусственных водоёмах, выдерживать высокую степень загрязнения воды, а имаго — питаться на широком круге хозяев [4].

Комары *Cx. pipiens* — один из основных видов — переносчиков вируса Западного Нила (ВЗН) [5, 6]. Несколько исследований определили векторную компетенцию этого вида для ВЗН [7, 8]. Температура среды обитания насекомых влияет на потенциал их вирусофорности, чем определяет их компетентность как переносчиков.

В связи с тем, что *Cx. p. f. molestus* часто встречается в подвалах городских построек, способен питаться на широком круге хозяев, в том числе на

человеке, синантропная форма при условии вирусофорности позволяет поддерживать передачу патогена в ряду поколений, что ведёт к формированию очага лихорадки Западного Нила (ЛЗН), активного в течение всего года.

При исследованиях, проведённых в Волгоградской области в 2012 г., комары *Cx. p. f. molestus* были обнаружены как в открытых городских биотопах, так и в окрестностях Волгограда: на их долю пришлось 19,4 и 34,2% вида *Cx. pipiens* соответственно. Широкое распространение формы *molestus* может привести к ухудшению эпидемиологической ситуации в регионе, поскольку самки указанной формы обладают значительно более высоким уровнем антропофилии, чем самки *pipiens* [9].

Целью данной работы было изучение влияния температуры среды обитания личинок на компетентность комаров *Cx. p. f. molestus* как переносчиков ВЗН.

Материалы и методы

Комары

Лабораторная культура комаров *Cx. p. f. molestus* была получена из Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского.

Имаго комаров содержали в вольерах (0,5 × 0,5 × 0,5 м), обтянутых сеткой, личинок — в эмалированных кюветах с отстоянной водой. Взрослых особей кормили 6% раствором глюкозы, личинок —

измельчённым кормом для котов («Kitekat», «Mars Inc.»). Насекомых содержали при 20–22°C с циклом день : ночь 12 : 12 ч и относительной влажности 60%.

Вирус

В экспериментах использовали штамм ВЗН Volg_601/18 2 генотипа, выделенный из комаров *Cx. modestus* Fic., отловленных на территории Волгоградской области (штамм депонирован в государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора под номером V-959; полногеномная последовательность в GenBank: MN619800).

Клеточные культуры

Клеточную культуру С6/36, полученную из Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, культивировали в среде С-46 при 25°C и атмосферном воздухе.

Клеточную культуру Vero выращивали в среде DMEM («БиолоТ») с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Sigma-Aldrich»), 1% L-глутамин («Gibco») и 1% антибиотика/антимикотика («Sigma-Aldrich») при 37°C, 5,5% CO₂ и 70% влажности.

Концентрацию вирусного изолята определяли методом бляшкообразования (количество бляшкообразующих единиц (БОЕ) на 1 мл) с использованием линии клеток Vero.

Заражение комаров ВЗН

Все манипуляции проводили в помещениях лаборатории, соответствующих уровню биологической безопасности BSL-3¹.

По 100 экземпляров личинок комаров 4-й стадии вносили в 3 флакона, содержащих по 50 мл культуральной среды с клетками С6/36, заражёнными ВЗН в титре 1×10^3 БОЕ/мл (погрешность $\pm 0,09 \times 10^3$ БОЕ/мл). Флаконы помещали в индивидуальные эксикаторы, которые затягивали марлей вместо крышки и ставили в термостаты на весь последующий цикл превращения и вылета имаго при температуре 20, 22 или 28°C и относительной влажности 60%. В течение 1 нед наблюдали за окуливанием и выходом имаго.

Через 72 ч после вылета всех имаго из куколок эксикаторы из термостатов помещали в холодильник (4°C) на 6–8 ч, обездвиженных холодом насекомых собирали, определяли их пол.

Определение компетентности комаров как переносчиков ВЗН

Для определения наличия ВЗН и его титра у самок комаров выделяли слюнные железы, поме-

щали их в стерильную пластиковую пробирку, ресуспендировали в 100 мкл ледяной культуральной среды DMEM («БиолоТ») с добавлением 2% эмбриональной телячьей сыворотки («Sigma-Aldrich»), 1% L-глутамин («Gibco») и 1% антибиотика/антимикотика («Sigma-Aldrich»). Аликвоты образцов десятикратно титровали до концентрации 1×10^{-5} и заражали ими монослой клеток линии Vero в 96-луночном планшете («Хеликон»). Культуральные планшеты инкубировали при 37°C, 5,5% CO₂ и 70% влажности в течение 14 дней. Культуральную среду из лунок, где наблюдался апоптоз клеток, исследовали на наличие РНК ВЗН методом ОТ-ПЦР.

Идентификация вируса

Окончательное подтверждение наличия РНК ВЗН в культуральной среде клеток линии Vero, заражённых материалом слюнных желёз комаров, осуществляли методом ОТ-ПЦР согласно прилагаемой к набору «АмплиСенс WNV-FL» инструкции.

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили в программе «Microsoft Excel 2010». Вычисляли средние арифметические значения, ошибки средних величин и доверительные интервалы. Данные представлены в виде $M \pm m$ при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты

Известно, что продолжительность цикла развития *Cx. pipiens* составляет до 1 мес. После выхода из яйца личинка питается бактериями, одноклеточными организмами, личинками других комаров посредством фильтрации воды и проходит 4 стадии метаморфоза. В стадии куколки насекомое не питается, живёт в среднем около 2–5 дней и превращается в имаго. Продолжительность цикла развития комаров находится в прямой связи с температурой окружающей среды и при её повышении сокращается. В наших исследованиях период развития *Cx. p. f. molestus* от яйца до имаго при их инкубации в условиях температуры атмосферного воздуха 20, 22 или 28°C составил 28, 26 и 21 день соответственно.

Для изучения влияния температуры среды обитания на компетентность комаров *Cx. p. f. molestus* как переносчиков ВЗН насекомых заражали перорально на 4-й личиночной стадии с последующей инкубацией при 20, 22 или 28°C атмосферного воздуха и анализом концентрации патогена в слюнных железах сформировавшихся взрослых самок.

Личинок комаров помещали в культуральную среду с клетками С6/36, заражёнными ВЗН Volg_601/18 в титре 1×10^3 БОЕ/мл (погрешность $\pm 0,09 \times 10^3$ БОЕ/мл). Предполагалось, что благодаря своим особенностям личинки будут питаться

¹ СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

инфицированными клетками, что и обусловит их пероральное заражение вирусом.

В результате работы обнаружено, что количество образовавшихся самок в каждой группе было статистически одинаковым, не зависело от температуры их содержания и равнялось 40 (20°C), 44 (22°C) и 42 (28°C) экземплярам. В слюнных железах у насекомых, развивающихся при 20°C, вирус не был обнаружен, при 22°C ВЗН был выявлен у 7 самок, при 28°C — у 19. Частота заражения ВЗН составила 0% при 20°C, 15,9% при 22°C и 45,2% при 28°C.

Из всех комаров *Cx. p. f. molestus*, в которых был обнаружен вирус, его концентрацию можно было определить только у 3 насекомых, содержащихся при 22°C, и у 15, которые инкубировались при 28°C. У остальных экземпляров ВЗН детектировали только молекулярно-генетическим методом.

Средний титр ВЗН в слюнных железах 3 самок, развивающихся при 22°C, составил $1,3 \times 10^2$ БОЕ/мл, при 28°C — $5,0 \times 10^4$ БОЕ/мл (погрешность $\pm 0,005 \times 10^3$ БОЕ/мл).

Обсуждение

В настоящем исследовании установлено отсутствие вируса в слюнных железах у заражённых ВЗН комаров при их развитии при температуре воздуха 20°C. В образцах слюны самок насекомых, содержащихся при 22°C, вирус обнаруживался, что указывает на возможность его трансмиссивной передачи. Вероятно, нижней границей температуры, при которой *Cx. p. f. molestus* становится компетентным переносчиком вируса, является 22°C. Аналогичные результаты были представлены в работе A.J. Folly и соавт. по изучению условий, ограничивающих заражение и системную диссеминацию вируса японского энцефалита у комаров *Cx. pipiens* [10]. Однако возможно, что при таких условиях насекомым требовался более длительный период для накопления ВЗН. Так, в ряде исследований показано, что при относительно низких температурах инкубационный период увеличивается до 15–22 дней в зависимости от конкретной комбинации вида комара и штамма ВЗН [11, 12].

Согласно данным литературы, повышение температуры среды обитания насекомых приводит к увеличению скорости репликации вируса, сокращению инкубационного периода и быстрому формированию высокой концентрации патогена в слюнных железах насекомых [13]. В нашей работе средний титр ВЗН в слюнных железах 3 самок, развивающихся при 28°C, составил $5,0 \times 10^4$ БОЕ/мл, что говорит не только о пероральном заражении личинок, но и о высокой скорости репликации патогена, т.к. исходный титр заражения ВЗН культуральной среды с клетками С6/36 был на порядок ниже (1×10^3 БОЕ/мл).

Таким образом, температура среды обитания является одним из ключевых факторов, ограничива-

ющих репликацию и концентрацию ВЗН в слюнных железах комаров *Cx. p. f. molestus*.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Byrne K., Nichols R.A. *Culex pipiens* in London underground tunnels: differentiation between surface and subterranean populations. *Heredity*. 1999; 82(Pt. 1): 7–15. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6884120>
2. Потапова Н.К. Заселенность городским комаром *Culex pipiens molestus* (Diptera, Culicidae) жилых массивов г. Ленска. *Паразитология*. 2005; 39(1): 73–9.
3. Маркович Н.Я., Заречная С.Н. Материалы по распространению *Culex pipiens* на территории СССР. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 1992; (1): 5–9.
4. Виноградова Е.Б. Комары комплекса *Culex pipiens* в России. *Труды Зоологического института РАН*. 1997; 271: 307.
5. Львов Д.К., Ковтунов А.И., Яшкулов К.Б., Громашевский В.Л., Джаркенов А.Ф., Щелканов М.Ю. и др. Особенности циркуляции вируса Западного Нила (Flaviviridae, Flavivirus) и некоторых других арбовирусов в экосистемах дельты Волги, Волго-Ахтубинской поймы. *Вопросы вирусологии*. 2004; 49(3): 45–52.
6. Kramer L.D., Styer L.M., Ebel G.D. A global perspective on the epidemiology of West Nile virus. *Annu. Rev. Entomol.* 2008; 53: 61–81. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093258>
7. Fortuna C., Remoli M.E., Di Luca M. et al. Experimental studies on comparison of the vector competence of four Italian *Culex pipiens* populations for West Nile virus. *Parasit. Vectors*. 2015; 8: 463. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1067-z>
8. Brustolin M., Talavera S., Santamaría C., Rivas R., Pujol N., Aranda C., et al. *Culex pipiens* and *Stegomyia albopicta* (= *Aedes albopictus*) populations as vectors for lineage 1 and 2 West Nile virus in Europe. *Med. Vet. Entomol.* 2016; 30(2): 166–73. <https://doi.org/10.1111/mve.12164>
9. Федорова М.В., Бородай Н.В., Шайкевич Е.В. Особенности пространственного распределения и зараженность вирусом Западного Нила комаров *Culex pipiens* L. в Волгоградской области. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2015; (1): 14–9.
10. Folly A.J., Dorey-Robinson D., Hernández-Triana L.M., Ackroyd S., Vidana B., Lean F.Z.X., et al. Temperate conditions restrict Japanese encephalitis virus infection to the mid-gut and prevents systemic dissemination in *Culex pipiens* mosquitoes. *Sci. Rep.* 2021; 11(1): 6133. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85411-2>
11. Reisen W.K., Fang Y., Martinez V.M. Effects of temperature on the transmission of West Nile virus by *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 2006; 43(2): 309–17. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2006\)043\[0309:eotott\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2006)043[0309:eotott]2.0.co;2)
12. Kilpatrick A.M., Meola M.A., Moudy R.M., Kramer L.D. Temperature, viral genetics, and the transmission of West Nile virus by *Culex pipiens* mosquitoes. *PLoS Pathog.* 2008; 4(6): e1000092. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000092>
13. Fros J.J., Miesen P., Vogels C.B., Gaibani P., Sambri V., Martina B.E., et al. Comparative Usutu and West Nile virus transmission potential by local *Culex pipiens* mosquitoes in north-western Europe. *One Health*. 2015; 1: 31–6. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2015.08.002>

REFERENCES

1. Byrne K., Nichols R.A. *Culex pipiens* in London underground tunnels: differentiation between surface and subterranean populations. *Heredity*. 1999; 82(Pt. 1): 7–15. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6884120>

2. Potapova N.K. Population of the mosquitoes *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae) in dwellings of Lensk city. *Parazitologiya*. 2005; 39(1): 73–9. (in Russian)
3. Markovich N.Ya., Zarechnaya S.N. Materials on the distribution of *Culex pipiens* on the territory of the USSR. *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni*. 1992; (1): 5–9. (in Russian)
4. Vinogradova E.B. Mosquitoes of the *Culex pipiens* complex in Russia. *Trudy Zoologicheskogo instituta RAN*. 1997; 271: 307. (in Russian)
5. L'vov D.K., Kovtunov A.I., Yashkulov K.B., Gromashevskiy V.L., Dzharkenov A.F., Shchelkanov M.Yu., et al. The specificity of circulation of West Nile virus (*Flaviviridae, Flavivirus*) and of some other arboviruses in the ecosystems of Volga delta, Volga-Akhtuba flood-lands and adjoining arid regions (2000–2002). *Voprosy virusologii*. 2004; 49(3): 45–52. (in Russian)
6. Kramer L.D., Styer L.M., Ebel G.D. A global perspective on the epidemiology of West Nile virus. *Annu. Rev. Entomol.* 2008; 53: 61–81. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093258>
7. Fortuna C., Remoli M.E., Di Luca M. et al. Experimental studies on comparison of the vector competence of four Italian *Culex pipiens* populations for West Nile virus. *Parasit. Vectors*. 2015; 8: 463. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1067-z>
8. Brustolin M., Talavera S., Santamaría C., Rivas R., Pujol N., Aranda C., et al. *Culex pipiens* and *Stegomyia albopicta* (= *Aedes albopictus*) populations as vectors for lineage 1 and 2 West Nile virus in Europe. *Med. Vet. Entomol.* 2016; 30(2): 166–73. <https://doi.org/10.1111/mve.12164>
9. Fedorova M.V., Boroday N.V., Shaykevich E.V. Features of spatial distribution and West Nile virus infection of *Culex pipiens* L. mosquitoes in the Volgograd region. *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni*. 2015; (1): 14–9. (in Russian)
10. Folly A.J., Dorey-Robinson D., Hernández-Triana L.M., Ackroyd S., Vidana B., Lean F.Z.X., et al. Temperate conditions restrict Japanese encephalitis virus infection to the mid-gut and prevents systemic dissemination in *Culex pipiens* mosquitoes. *Sci. Rep.* 2021; 11(1): 6133. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85411-2>
11. Reisen W.K., Fang Y., Martinez V.M. Effects of temperature on the transmission of West Nile virus by *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 2006; 43(2): 309–17. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2006\)043\[0309:eotott\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2006)043[0309:eotott]2.0.co;2)
12. Kilpatrick A.M., Meola M.A., Moudy R.M., Kramer L.D. Temperature, viral genetics, and the transmission of West Nile virus by *Culex pipiens* mosquitoes. *PLoS Pathog.* 2008; 4(6): e1000092. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000092>
13. Fros J.J., Miesen P., Vogels C.B., Gaibani P., Sambri V., Martina B.E., et al. Comparative Usutu and West Nile virus transmission potential by local *Culex pipiens* mosquitoes in north-western Europe. *One Health*. 2015; 1: 31–6. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2015.08.002>

Информация об авторах

Молчанова Елена Владимировна — к.б.н., с.н.с. лаб. арбовирусных инфекций Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, Волгоград, Россия, elenakalinki@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3722-8159>

Лучинин Дмитрий Николаевич — н.с. лаб. арбовирусных инфекций Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6784-9648>

Мачнева Анастасия Юрьевна — н.с. лаб. арбовирусных инфекций Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1910-3731>

Герасимова Арина Дмитриевна — н.с. лаб. арбовирусных инфекций Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8247-6931>

Несговорова Анна Владимировна — н.с. сектора эпизоотологического мониторинга Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5810-8864>

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

Плеханова Наталья Геннадьевна — к.б.н., в.н.с. лаб. экспериментальных биомоделей Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2471-8776>

Батурин Артем Александрович — н.с. лаб. генодиагностики Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9510-7246>

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 30.05.2022;
принята к публикации 29.07.2022;
опубликована 30.10.2022

Information about the authors

Elena V. Molchanova — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of arbovirus infections, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russia, elenakalinki@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3722-8159>

Dmitry N. Luchinin — н.с. лаб. арбовирусных инфекций ВолНИПЧИ, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6784-9648>

Anastasiya Yu. Machneva — researcher, Laboratory of arbovirus infections, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1910-3731>

Arina D. Gerasimova — researcher, Laboratory of arbovirus infections, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8247-6931>

Anna V. Nesgovorova — researcher, sector of epizootic monitoring, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5810-8864>

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

Natalya G. Plekhanova — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of experimental biomodels, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2471-8776>

Artem A. Baturin — researcher, Laboratory of gene diagnostics, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9510-7246>

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 30.05.2022;
accepted for publication 29.07.2022;
published 30.10.2022



Влияние трипсина, лидазы и флуимуцила на рост биоплёнок *Bordetella pertussis* на абиотическом субстрате

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

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

Аннотация

Цель работы — изучение влияния трипсина, лидазы (гиалуронидазы) и флуимуцила (N-ацетил-L-цистеин) на рост биоплёнок штаммов *Bordetella pertussis* на абиотическом субстрате.

Материалы и методы. В опытах использовали выделенные в России от больных коклюшем в 2001–2010 гг. штаммы основных сероваров *B. pertussis*: № 178 (серовар 1.2.0), № 287 (серовар 1.0.3) и № 317 (серовар 1.2.3), выращенных на плотной питательной среде. Интенсивность образования биоплёнок в жидкой питательной среде в присутствии трипсина, лидазы и флуимуцила в круглодонных полистироловых 96-луночных планшетах оценивали при окрашивании 0,1% раствором генциан-фиолетового.

Результаты. Трипсин подавлял рост биоплёнок и разрушал сформированные биоплёнки. Лидаза менее активно подавляла рост биоплёнок, не оказывая влияния на сформированные биоплёнки. Флуимуцил не влиял как на рост биоплёнок, так и на сформированные биоплёнки. При посеве надосадочных жидкостей из культур в присутствии препаратов, а также из лунок контроля культуры на плотную питательную среду был отмечен рост типичных для *B. pertussis* колоний.

Заключение. Различный эффект исследованных нами препаратов может быть связан с различным количеством содержанием мишеней для трипсина (протеины), лидазы (мукополисахариды, содержащие уроновые кислоты), флуимуцила (кислые мукополисахариды) в составе матрикса биоплёнок. Рост типичных по морфологическим свойствам колоний *B. pertussis* при посеве надосадков культур на плотную питательную среду свидетельствует о разрушении матрикса биоплёнок трипсином и лидазой при отсутствии влияния на планктонные клетки.

Ключевые слова: штаммы *B. pertussis*, биоплёнки, трипсин, флуимуцил, лидаза, матрикс

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

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

Для цитирования: Зайцев Е.М., Брицина М.В., Озерецковская М.Н., Бажанова И.Г. Влияние трипсина, лидазы и флуимуцила на рост биоплёнок *Bordetella pertussis* на абиотическом субстрате. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(5):545–551.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-218>

Original article
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-218>

Effect of trypsin, lidase and flumucil on the growth of *Bordetella pertussis* biofilms on an abiotic substrate

Evgeniy M. Zaytsev[✉], Marina V. Britsina, Maria N. Ozeretskovskaya, Irina G. Bazhanova

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

Abstract

Aim. Study the effect of trypsin, lidase (hyaluronidase) and flumucil (N-acetyl-L-cysteine) on the growth of biofilms of *Bordetella pertussis* strains on the abiotic substrate.

Materials and methods. In the experiments, the strains of the main *B. pertussis* serotypes isolated in the Russian Federation from whooping cough patients in 2001–2010 were used: No. 178 (serotype 1.2.0), No. 287 (serotype 1.0.3) and No. 317 (serotype 1.2.3), grown on a dense nutrient medium. The intensity of biofilm formation in a liquid nutrient medium in the presence of trypsin, lidase and flumucil in round-bottomed polystyrene 96-well plates was estimated by staining with 0.1% gentian-violet solution.

Results. Trypsin suppressed the growth of biofilms and destroyed the formed biofilms. Lidase suppressed the growth of biofilms less actively, without affecting the formed biofilms. Fluimucil did not affect both the growth of biofilms and the formed biofilms. The growth of colonies typical for *B. pertussis* was noted when planting fluids from cultures in the presence of preparations, as well as from culture control wells on a dense nutrient medium.

Conclusion. The different effect of the drugs studied by us may be related to the different quantitative content of targets for trypsin (proteins), lidase (mucopolysaccharides, containing uronic acids), fluimucil (acid mucopolysaccharides) in the biofilm matrix. The growth of the typical morphological properties of the colony of *B. pertussis* during the sowing of culture seedlings on a dense nutrient medium testifies to the destruction of the biofilm matrix by trypsin and lidase in the absence of influence on plankton cells.

Keywords: *B. pertussis* strains, biofilms, trypsin, fluimucil, lidase, matrix

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

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

For citation: Zaytsev E.M., Britsina M.V., Ozeretskoykaya M.N., Bazhanova I.G. Effect of trypsin, lidase and fluimucil on the growth of *Bordetella pertussis* biofilms on an abiotic substrate. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(5):545–551. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-218>

Введение

Коклюш остаётся актуальной проблемой здравоохранения во всём мире, в том числе в странах с высоким уровнем вакцинации [1–3]. Одной из вероятных причин продолжающейся циркуляции возбудителя коклюша может быть формирование в респираторном тракте биоплёнок *B. pertussis*, отличающихся от планктонных клеток повышенной устойчивостью к иммунной системе хозяина, антибактериальным препаратам и другим факторам [4]. В связи с этим важной задачей является разработка методов, направленных на подавление роста биоплёнок *B. pertussis* и разрушение сформированных биоплёнок в макроорганизме [5]. Полимерный матрикс является важным структурным компонентом биоплёнок, защищающим бактерии от повреждающих факторов внешней среды [6]. Одним из подходов к борьбе с биоплёнками является поиск препаратов, способных разрушать их матрикс, что облегчает доступ антибактериальных препаратов к микробным клеткам и повышает их чувствительность к факторам иммунной системы.

Чувствительность биоплёнок *B. pertussis* к препаратам, способным разрушать компоненты матрикса в респираторном тракте и на абиотических субстратах, пока изучена недостаточно, по данной проблеме имеются лишь единичные публикации.

Цель работы — изучение влияния трипсина, лидазы и флуимуцила на рост биоплёнок *B. pertussis* на абиотическом субстрате.

Материалы и методы

В работе использовали выделенные в России от больных коклюшем в 2001–2010 гг. штаммы № 178 (серовар 1.2.0), № 287 (серовар 1.0.3) и штамм № 317 (серовар 1.2.3). В опытах использовали трипсин кристаллический (ООО «Самсон-Мед»), лидазу (гиалуронидаза; АО «НПО «Микроген»), флуимуцил (N-ацетил-L-цистеин; «Zambon»). Контроль морфологических, серологических и культураль-

ных свойств штаммов проводили в соответствии с Методическими указаниями [7].

В качестве инокулята для получения биоплёнок использовали ночные культуры штаммов, выращенных на плотной питательной среде «Бордетеллагар» (Питательная среда для культивирования и выделения коклюшного микроба сухая; ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии). Для образования биоплёнок бактерии культивировали в 96-луночных пластиковых планшетах («Медполимер») в жидкой синтетической питательной среде в соответствии с ранее описанным методом [8]. Культуры штаммов в жидкой синтетической питательной среде в концентрации 10 МОЕ (10 млрд микробных клеток/мл) в объёме 100 мкл вносили в лунки планшетов. После этого в лунки вносили по 100 мкл раствора ферментных препаратов и выдерживали планшеты в термостате при 37°C в течение 24 ч. Трипсин использовали в концентрациях 100, 10 и 1 мкг/мл, лидазу — 160, 80 и 40 МЕ/мл, флуимуцил — 1000, 100 и 10 мкг/мл. Для изучения влияния препаратов на сформированные биоплёнки в лунки планшетов вносили по 100 мкл культур штаммов при концентрации микробных клеток 10 МОЕ и 100 мкл питательной среды. Планшеты выдерживали в термостате при 37°C в течение 24 ч, после чего промывали лунки планшетов питательной средой, добавляли в лунки по 0,2 мл раствора препаратов в разных дозах в жидкой питательной среде и инкубировали планшеты в течение 2 ч при 37°C. После культивирования бактерий из лунок планшетов осторожно отбирали надосадочную жидкость в объёме 0,1 мл и высевали на косячки с плотной питательной средой («Бордетеллагар»), которые инкубировали в термостате при 37°C в течение 2 сут. Интенсивность образования биоплёнок в планшетах оценивали окрашиванием 0,1% раствором генцианвиолета по показателям оптической плотности (ОП) окрашенного растворителя по отношению к негативному контролю (ОП_к = 0,047),

как плотные ($OP \geq 0,188$), умеренные ($0,094 \leq OP < 0,188$), слабые ($0,070 \leq OP < 0,094$), отсутствие биоплёнок ($0,047 < OP < 0,070$). Результаты оценивали по значениям доз ферментов, которые определяли как наибольшие их разведения, подавляющие рост биоплёночных культур по сравнению с контролем (слабые биоплёнки или их отсутствие, а также умеренные биоплёнки, по значениям ОП статистически достоверно отличающиеся от контроля). Формирование плотных и умеренных биоплёнок в присутствии ферментов рассматривали как устойчивость к ферментам. Для достоверного обобщения результатов использовали 5 лунок на один опытный образец и рассчитывали среднюю величину ОП опытного образца и удвоенную ошибку. Сравнения проводили по *t*-критерию Стьюдента [9].

Результаты

Контрольные культуры всех исследованных штаммов в данной серии опытов формировали умеренные биоплёнки. Все исследованные штаммы при формировании биоплёнок проявляли чувствительность к трипсину и лидазе (табл. 1, 2). Трипсин

в концентрации 100 мкг/мл полностью подавлял рост биоплёнок, а в концентрации 10 мкг/мл также полностью подавлял рост биоплёнок или значительно снижал интенсивность их образования (слабые биоплёнки). При концентрации трипсина 1 мкг/мл отмечен умеренный рост биоплёнок, однако по интенсивности образования данные биоплёнки статистически достоверно отличались от биоплёнок, полученных в контроле (культуры без добавления трипсина). Добавление трипсина к сформированным биоплёнкам приводило к их деструкции. При концентрации трипсина 100 мкг/мл отмечено отсутствие биоплёнок. Биоплёнки регистрировались как слабые у всех 3 штаммов при концентрации трипсина в дозе 10 мкг/мл. При концентрации трипсина 1 мкг/мл все штаммы образовывали умеренные биоплёнки. При этом отмечена статистически достоверная разница по сравнению с контролем.

Лидаза также подавляла образование биоплёнок всех штаммов. При концентрации 160 МЕ/мл формировались слабые биоплёнки, а при концентрации 80 МЕ/мл формировались слабые или умеренные биоплёнки, статистически достоверно

Таблица 1. Влияние препаратов на формирование биоплёнок штаммами *B. pertussis*

Table 1. Effect of drugs on biofilm formation by *B. pertussis* strains

Дозы препаратов Doses of drugs	Значения ОП/интенсивность биоплёнок Optical density values/biofilm intensity		
	штаммы (серовар) strains (serovar)		
	№ 317 (1.2.3)	№ 287 (1.0.3)	№ 178 (1.2.0)
Контроль культуры Culture control	0,181 ± 0,007 умеренная medium	0,160 ± 0,002 умеренная medium	0,154 ± 0,001 умеренная medium
Трипсин, мкг/мл Trypsin, µg/ml			
100	0,045 ± 0,005* нет no	0,041 ± 0,002* нет no	0,041 ± 0,002* нет no
10	0,061 ± 0,015* слабая weak	0,054 ± 0,001* нет no	0,071 ± 0,001* слабая weak
1	0,113 ± 0,007* умеренная medium	0,111 ± 0,001* умеренная medium	0,095 ± 0,002* умеренная medium
Лидаза, МЕ/мл Lidaza, IU/ml			
160	0,084 ± 0,008* слабая weak	0,084 ± 0,004* слабая weak	0,079 ± 0,002* слабая weak
80	0,087 ± 0,006* слабая weak	0,096 ± 0,002* умеренная medium	0,081 ± 0,004* слабая weak
40	0,101 ± 0,007* умеренная medium	0,115 ± 0,005* умеренная medium	0,110 ± 0,002* умеренная medium
Флуимуцил, мкг/мл Fluimucil, µg/ml			
1000	0,157 ± 0,006 умеренная medium	0,158 ± 0,003 умеренная medium	0,153 ± 0,005 умеренная medium
100	0,174 ± 0,008 умеренная medium	0,159 ± 0,005 умеренная medium	0,154 ± 0,007 умеренная medium
10	0,172 ± 0,009 умеренная medium	0,158 ± 0,007 умеренная medium	0,152 ± 0,003 умеренная medium

Примечание. Здесь и в табл. 2: * — подавление роста биоплёнок (различия между опытными образцами и контролем статистически достоверны ($p < 0,05$)).

Note. Here and in the Table 2: * — suppression of biofilm growth (differences between experimental samples and control are statistically significant ($p < 0.05$)).

Таблица 2. Влияние препаратов на сформированные биоплёнки штаммов *B. pertussis***Table 2.** The effect of drugs on the formed biofilms of *B. pertussis* strains

Дозы препаратов Doses of drugs	Значения ОП/интенсивность биоплёнок Optical density values/biofilm intensity		
	Штаммы (серовар) Strains (serovar)		
	№ 317 (1.2.3)	№ 287 (1.0.3)	№ 178 (1.2.0)
Контроль культуры Culture control	0,178 ± 0,010 умеренная medium	0,158 ± 0,003 умеренная medium	0,155 ± 0,002 умеренная medium
Трипсин, мкг/мл Trypsin, µg/ml			
100	0,070 ± 0,006* слабая weak	0,041 ± 0,002* нет no	0,039 ± 0,001* нет no
10	0,078 ± 0,016* слабая weak	0,086 ± 0,007* слабая weak	0,079 ± 0,007* слабая weak
1	0,110 ± 0,014* умеренная medium	0,120 ± 0,005* умеренная medium	0,115 ± 0,009* умеренная medium
Лидаза, МЕ/мл Lidaza, IU/ml			
160	0,161 ± 0,016 умеренная medium	0,157 ± 0,001 умеренная medium	0,142 ± 0,015 умеренная medium
80	0,181 ± 0,008 умеренная medium	0,159 ± 0,007 умеренная medium	0,135 ± 0,013 умеренная medium
40	0,179 ± 0,015 умеренная medium	0,156 ± 0,005 умеренная medium	0,145 ± 0,010 умеренная medium
Флуимуцил, мкг/мл Flumucil, µg/ml			
1000	0,191 ± 0,014 умеренная medium	0,157 ± 0,007 умеренная medium	0,152 ± 0,003 умеренная medium
100	0,181 ± 0,015 умеренная medium	0,159 ± 0,010 умеренная medium	0,156 ± 0,007 умеренная medium
10	0,179 ± 0,016 умеренная medium	0,157 ± 0,003 умеренная medium	0,154 ± 0,005 умеренная medium

отличавшиеся от контроля (культуры без добавления лидазы). При концентрации 40 МЕ/мл все штаммы формировали умеренные биоплёнки. При этом отмечена статистически достоверная разница по сравнению с контролем. При добавлении лидазы в дозах 160, 80 и 40 МЕ/мл к сформированным биоплёнкам не выявлено статистически значимой разницы в образовании биоплёнок по сравнению с контролем.

Флуимуцил не оказывал влияния как на формирование биоплёнок всеми штаммами, так и на уже сформированные биоплёнки. При добавлении флуимуцила в концентрациях 1000, 100 и 10 мкг/мл формировались умеренные биоплёнки, как в контрольных культурах.

При посеве надосадочных жидкостей из культур в присутствии препаратов, а также из лунок с контролем культуры на плотную питательную среду был отмечен рост типичных для *B. pertussis* мелких колоний размером 0,5–1,0 мм, выпуклых, круглых, с ровными краями, серого цвета, блестящих. Исследование морфологических свойств микробных клеток показало, что они представляют собой неподвижные, граммотрицательные, овоидной формы мелкие палочки, располагающиеся в мазках отдельно или парами.

Обсуждение

Экзополимерный матрикс является важным структурным компонентом биоплёнок, защищающим бактерии от повреждающих факторов внешней среды, в том числе иммунной системы, антибиотиков [10]. Матрикс бактериальных биоплёнок включает экзополисахаридный компонент, липополисахариды, протеины, нуклеиновые кислоты, лектины и минералы. Различные виды бактерий и различные штаммы внутри одного и того же вида продуцируют различные типы матричных полимеров с различным химическим составом и физическим свойствам. Разрушая внеклеточный полимерный матрикс биоплёнок, можно добиться их повреждения, а также повысить эффективность антибиотиков. Каждый компонент матрикса может служить мишенью для веществ, способных вызывать их разрушение [11, 12]. Одним из подходов к разрушению биоплёнок является ферментативный гидролиз их матрикса. К ферментам, разрушающим матрикс биоплёнки, относятся протеазы, дезоксирибонуклеазы, а также гликозил-гидролазы, катализирующие гидролиз гликозидных связей в молекулах углеводов. Так, использование ДНКазы предотвращало образование биоплёнок представителями рода *Staphylococcus* и *Enterococcus in vitro* [13]. Показано, что обработка

биоплёнок *Pseudomonas aeruginosa in vivo* и *ex vivo* гликозил-гидролазой приводила к разрушению матрикса и переходу микробных клеток в планктонное состояние, что сопровождалось повышением их чувствительности к антибиотикам [11, 14]. Протеолитические ферменты, катализирующие гидролиз белков, давно применяются при лечении пациентов с длительно незаживающими ранами и ожогами, в частности, в составе коммерческих препаратов «Трипсин», «Химотрипсин», «Лидаза», «Коллализин» и др. Недавно была показана возможность использования протеолитических ферментов для борьбы с бактериальными биоплёнками на поверхности ран, тканей, медицинских изделий [15].

Нами исследована чувствительность биоплёнок основных сероваров (1.0.3, 1.2.0 и 1.2.3) свежeweделенных штаммов коклюшного микроба к двум ферментным препаратам (трипсину, лидазе) и флуимуцилу. Использованные нами препараты отличались по влиянию на биоплёнки. Наибольшую активность проявлял трипсин, подавлявший рост биоплёнок и разрушавший сформированные биоплёнки. Лидаза менее активно подавляла рост биоплёнок, не оказывая влияния на сформированные биоплёнки. Флуимуцил не влиял на рост биоплёнок и на сформированные биоплёнки.

По отношению ко всем штаммам выявлена зависимость интенсивности роста биоплёнок от разведения концентрации препаратов. Снижение концентрации трипсина и лидазы сопровождалось усилением роста биоплёнок.

В целом мы не обнаружили существенных различий между исследованными штаммами *B. pertussis* основных сероваров по чувствительности к трипсину, лидазе и флуимуцилу.

Различный эффект исследованных нами препаратов можно объяснить механизмом их действия на матрикс биоплёнок *B. pertussis*, основными компонентами которого являются протеины, полисахаридный полимер, липополисахарид и экстрацеллюлярная ДНК [6]. Трипсин представляет собой эндогенный протеолитический фермент, разрывающий пептидные связи в молекуле белка, а также расщепляющий высокомолекулярные продукты распада белков и некоторые низкомолекулярные пептиды. Таким образом, подавление роста биоплёнок *B. pertussis* и разрушение сформированных биоплёнок трипсином можно объяснить протеолизом белков матрикса, что привело к его деградации. Лидаза (гиалуронидаза) расщепляет основной компонент межклеточного вещества соединительной ткани — мукополисахарид, в состав которого входят ацетилглюкозамин и глюкуроновая кислота. Гиалуроновая кислота является одним из основных компонентов внеклеточного матрикса, содержится во многих биологических жидкостях (слюне, синовиальной жидкости и др.), а также продуциру-

ется некоторыми бактериями. Наличие уроновых кислот также выявлено в составе полисахаридного полимера биоплёнок *B. pertussis* [16]. Присутствие уроновых кислот в матриксе бактерий может играть важную роль в вирулентности, способствуя стабилизации гликозидных связей с помощью карбоновой кислоты и придавая биоплёночным бактериям более высокую устойчивость к кислотному гидролизу. Также важно отметить, что продукция экзополимеров, содержащая уроновые кислоты, бактериями, колонизирующими дыхательный и кишечный тракты, может способствовать их агрегированию и адгезии к клеткам респираторного тракта. Таким образом, эффект лидазы на биоплёнки можно объяснить расщеплением мукополисахаридов, содержащих уроновые кислоты, что приводило к разрушению матрикса.

Флуимуцил (N-ацетил-L-цистеин) широко используется в качестве муколитического агента для лечения заболеваний бронхолегочной системы. Действие флуимуцила обусловлено его способностью разрывать дисульфидные связи кислых мукополисахаридов. Препарат обладает способностью уменьшать адгезию некоторых возбудителей к слизистым оболочкам, а также оказывает прямое разрушающее воздействие на внеклеточный матрикс, что позволяет рассматривать его в качестве терапии инфекций, связанных с образованием биоплёнок. В частности, показана способность флуимуцила подавлять образование биоплёнок *Pseudomonas aeruginosa* и *Vibrio cholerae* [17]. Отсутствие влияния флуимуцила на биоплёнки *B. pertussis* может указывать на различия в содержании кислых мукополисахаридов в составе матрикса биоплёнок разных микроорганизмов. Рост типичных по морфологическим свойствам колоний *B. pertussis* при посеве на плотную питательную среду свидетельствует о разрушении матрикса биоплёнок трипсином и лидазой и отсутствии влияния на планктонные клетки. Разрушение матрикса вызывает дисперсию бактерий, т.е. переход в состояние, близкое к планктонному фенотипу, что делает их более восприимчивыми к факторам иммунной системы и антибактериальным препаратам. Однако в настоящее время иммунобиологические свойства диспергированных из биоплёнок клеток изучены недостаточно. Потенциально они способны к диссеминации, реколонизации, бактериемии и септицемии. В связи с этим важное значение имеет изучение комбинированного действия препаратов, разрушающих матрикс биоплёнок, с антибактериальными препаратами [14].

Полученные нами результаты открывают перспективы для изучения влияния ферментных препаратов на рост биоплёнок *B. pertussis* на экспериментальных животных, в том числе в сочетании с антибактериальными препаратами, для разработки эффективных препаратов для лечения коклюшной инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

- Nguyen V.T.N., Simon L. Pertussis: The whooping cough. *Prim. Care.* 2018; 45(3): 423–31. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2018.05.003>
- Polinori I., Esposito S. Clinical findings and management of pertussis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019; 1183: 151–60. https://doi.org/10.1007/5584_2019_410
- Ломоносова А.В. Причины и последствия несвоевременной вакцинации против коклюшной инфекции в Российской Федерации. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2020; 97(5): 492–52. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-11> (in Russian)
- Cattelan N., Dubey P., Arnal L., Yantorno O.M., Deora R. *Bordetella* biofilms: a lifestyle leading to persistent infections. *Pathog. Dis.* 2016; 74(1): ftv108. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv108>
- Cattelan N., Yantorno O.M., Deora R. Structural analysis of *Bordetella pertussis* biofilms by confocal laser scanning microscopy. *Bio Protoc.* 2018; 8(15): e2953. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.295>
- Conover M.S., Mishra M., Deora R. Extracellular DNA is essential for maintaining *Bordetella* biofilm integrity on abiotic surfaces and in the upper respiratory tract of mice. *PLoS One.* 2011; 6(2): e16861. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016861>
- МУК 4.2.2317-08. Отбор, проверка и хранение производственных штаммов коклюшных, паракклюшных и бронхисептических бактерий. М.; 2009.
- Зайцев Е.М., Брицина М.В., Озерцовская М.Н., Мерцалова Н.У., Бажанова И.Г. Культивирование биоплёнок *Bordetella pertussis* на абиотическом субстрате. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2019; 96(1): 49–53. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-1-49-53>
- Ашмарин И.П., Воробьев А.А. *Статистические методы в микробиологических исследованиях.* Ленинград; 1962.
- Uruén C., Chopo-Escuin G., Tommassen J., Mainar-Jaime R.C., Arenas J. Biofilms as promoters of bacterial antibiotic resistance and tolerance. *Antibiotics (Basel).* 2020; 10(1): 3. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010003>
- Kovach K.N., Fleming D., Wells M.J., Rumbaugh K.P., Gordon V.D. Specific disruption of established *Pseudomonas aeruginosa* biofilms using polymer-attacking enzymes. *Langmuir.* 2020; 36(6): 1585–95. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b02188>
- Fleming D., Rumbaugh K. The consequences of biofilm dispersal on the host. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 10738. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29121-2>
- Окулич В.К., Кабанова А.А., Плотников Ф.В. *Микробные биоплёнки в клинической микробиологии и антибактериальной терапии.* Витебск; 2017.
- Wille J., Coenye T. Biofilm dispersion: The key to biofilm eradication or opening Pandora's box? *Biofilm.* 2020; 2: 100027. <https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2020.100027>
- Каюмов А.Р., Тризна Е.Ю., Шарафутдинов И.С., Байдамшина Д.Р., Рыжикова М.Н. *Биоплёнки как фактор патогенности Staphylococcus aureus: подходы к терапии.* Казань; 2017.
- Bosch A., Serra D., Prieto C., Schmitt J., Naumann D., Yantorno O. Characterization of *Bordetella pertussis* growing as biofilm by chemical analysis and FT-IR spectroscopy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006; 71(5): 736–47. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0202>
- Дуванова О.В., Мишанькин Б.Н., Титова С.В., Корнеева Л.А. Действие N-ацетил-L-цистеина на биоплёнки холерного вибриона. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2018; 95(2): 83–7. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-2-83-87>
- Polinori I., Esposito S. Clinical findings and management of pertussis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019; 1183: 151–60. https://doi.org/10.1007/5584_2019_410
- Lomonosova A.V. Causes and consequences of delayed vaccination against pertussis infection in the Russian Federation. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2020; 97(5): 492–52. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-11> (in Russian)
- Cattelan N., Dubey P., Arnal L., Yantorno O.M., Deora R. *Bordetella* biofilms: a lifestyle leading to persistent infections. *Pathog. Dis.* 2016; 74(1): ftv108. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv108>
- Cattelan N., Yantorno O.M., Deora R. Structural analysis of *Bordetella pertussis* biofilms by confocal laser scanning microscopy. *Bio Protoc.* 2018; 8(15): e2953. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.295>
- Conover M.S., Mishra M., Deora R. Extracellular DNA is essential for maintaining *Bordetella* biofilm integrity on abiotic surfaces and in the upper respiratory tract of mice. *PLoS One.* 2011; 6(2): e16861. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016861>
- Guidelines MUK 4.2.2317-08. Selection, verification and storage of production strains of pertussis, parapertussis and bronchisepticose bacteria. Moscow; 2009. (in Russian)
- Zaytsev E.M., Britsina M.V., Ozeretskovskaya M.N., Mertsalova N.U., Bazhanova I.G. Cultivation of *Bordetella pertussis* biofilms on abiotic substrate. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2019; 96(1): 49–53. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-1-49-53> (in Russian)
- Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. *Statistical Methods in Microbiological Research [Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyakh].* Leningrad; 1962. (in Russian)
- Uruén C., Chopo-Escuin G., Tommassen J., Mainar-Jaime R.C., Arenas J. Biofilms as promoters of bacterial antibiotic resistance and tolerance. *Antibiotics (Basel).* 2020; 10(1): 3. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010003>
- Kovach K.N., Fleming D., Wells M.J., Rumbaugh K.P., Gordon V.D. Specific disruption of established *Pseudomonas aeruginosa* biofilms using polymer-attacking enzymes. *Langmuir.* 2020; 36(6): 1585–95. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b02188>
- Fleming D., Rumbaugh K. The consequences of biofilm dispersal on the host. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 10738. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29121-2>
- Okulich V.K., Kabanova A.A., Plotnikov F.V. *Microbial Biofilms in Clinical Microbiology and Antibacterial Therapy [Mikrobynye bioplenki v klinicheskoy mikrobiologii i antibakterial'noy terapii].* Vitebsk; 2017. (in Belarusian)
- Wille J., Coenye T. Biofilm dispersion: The key to biofilm eradication or opening Pandora's box? *Biofilm.* 2020; 2: 100027. <https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2020.100027>
- Kayumov A.R., Trizna E.Yu., Sharafutdinov I.S., Baydamshina D.R., Ryzhikova M.N. *Biofilms as a Pathogenicity Factor of Staphylococcus Aureus: Approaches to Therapy [Bioplenki kak faktor patogenosti Staphylococcus aureus: podkhody k terapii].* Kazan'; 2017. (in Russian)
- Bosch A., Serra D., Prieto C., Schmitt J., Naumann D., Yantorno O. Characterization of *Bordetella pertussis* growing as biofilm by chemical analysis and FT-IR spectroscopy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006; 71(5): 736–47. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0202>
- Duvanova O.V., Mishan'kin B.N., Titova S.V., Korneeva L.A. The effect of N-acetyl-L-cysteine on biofilm of *Vibrio cholerae*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2018; 95(2): 83–7. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-2-83-87> (in Russian)

REFERENCES

- Nguyen V.T.N., Simon L. Pertussis: The whooping cough. *Prim. Care.* 2018; 45(3): 423–31. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2018.05.003>

Информация об авторах

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

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

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

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

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

Статья поступила в редакцию 12.05.2022;
принята к публикации 19.07.2022;
опубликована 31.10.2022

Information about the authors

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

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

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

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

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

The article was submitted 12.05.2022;
accepted for publication 19.07.2022;
published 31.10.2022

Научная статья
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-245>



Модифицированная питательная среда для выделения и идентификации неферментирующих бактерий

Алешукина А.В.✉, Голошва Е.В.

Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия

Аннотация

Введение. Актуальность данного исследования обусловлена необходимостью лабораторного мониторинга за циркуляцией неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОБ), имеющих высокую этиологическую значимость в возникновении инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, а также трудоёмкостью дифференциации данных бактерий на простых питательных средах от представителей энтеробактерий и отдельных представителей НГОБ.

Целью данного исследования явилось конструирование дифференциально-диагностической среды, содержащей отечественные ингредиенты.

Материалы и методы. Определяли эффективность роста тест-штаммов на сопоставляемых питательных средах, их культуральные и морфологические признаки.

Результаты. Предлагаемая модифицированная питательная среда позволяет по цвету колоний и характеру роста как отличать тест-штаммы НГОБ от тест-штаммов других бактерий (грамотрицательных энтеробактерий, стафилококков), так и различать их между собой, что даёт возможность применять предлагаемую модифицированную питательную среду для дифференциации неферментирующих бактерий от ферментирующих и одновременно первичной дифференциации разных представителей неферментирующих бактерий по изменению цвета среды и цвету колоний.

Ключевые слова: грамотрицательные неферментирующие бактерии, дифференциально-диагностические среды, внутрибольничные инфекции, индикатор, тест-штаммы

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: Алешукина А.В., Голошва Е.В. Модифицированная питательная среда для выделения и идентификации неферментирующих бактерий. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2022;99(5):552–556. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-245>

Original article
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-245>

Modified nutrient medium for isolation and identification of non-fermenting bacteria

Anna V. Aleshukina✉, Elena V. Goloshva

Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology, Rostov-on-Don, Russia

Abstract

The **relevance** of this study is due to the need for laboratory monitoring of the circulation of gram-negative non-fermenting bacteria that have a high etiological significance in the occurrence of nosocomial infections, as well as the complexity of differentiating these bacteria on simple nutrient media from representatives of enterobacteria and between individual representatives of gram-negative non-fermenting bacteria.

The **purpose** of this study was to design a differential diagnostic medium containing domestic ingredients.

Materials and methods. The growth efficiency of test strains on comparable nutrient media, their cultural and morphological characteristics were determined.

Results. The modified culture medium makes it possible to distinguish test strains of gram-negative non-fermenting bacteria from test strains of other bacteria (gram-negative enterobacteria, *Staphylococcus*), and between these strains by the color of the colonies and growth patterns. This feature gives the opportunity to apply modified medium for the differentiation of non-fermentative bacteria from fermenting ones and, simultaneously, for the primary differentiation of different representatives of non-fermenting bacteria by changing the color of the medium and different color of colonies.

Keywords: *gram-negative non-fermenting bacteria, differential diagnostic media, nosocomial infections, indicator, test strains*

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: Aleshukina A.V., Goloshva E.V. Modified nutrient medium for isolation and identification of non-fermenting bacteria. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(5):552–556. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-245>

Введение

Неферментирующие грамотрицательные бактерии (НГОБ) являются одними из основных возбудителей внутрибольничных инфекций. Частота возникновения обусловленных НГОБ внутрибольничных инфекций достигает 15% от всех инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, аэробными и факультативно-аэробными грамотрицательными бактериями. При этом их видовой состав в последние годы существенно расширился [1–5].

Выделение штаммов НГОБ на простых питательных средах типа мясопептонного или кровяного агара осложнено, поскольку в этих средах сильнее разрастаются культуры *Staphylococcus* и других сопутствующих бактерий, маскирующих присутствие НГОБ. При этом идентификация НГОБ на указанных средах также затруднена в связи с малой ферментативной активностью данных штаммов и относительной близостью их морфологических и культуральных признаков.

Трудности, возникающие в лабораторной практике при выделении и дифференциации НГОБ из образцов клинического материала, стимулировали разработку различных дифференциально-диагностических сред для выделения НГОБ.

В современной бактериологической практике для выделения штаммов НГОБ из клинических образцов используется широкий спектр питательных сред отечественного и зарубежного производства. Например, для выделения штаммов *Pseudomonas aeruginosa* из клинических образцов и для дифференцирования их от других псевдомонад на основании формирования пигмента пиоцианина используют BD *Pseudomonas Isolation Agar* (агар для выделения псевдомонад). Зарубежные фирмы предлагают для селективного выделения *P. aeruginosa* среды с цетримидом. Поскольку питательная среда с цетримидом обладает низкой аналитической чувствительностью (возможен рост клебсиелл и серраций), ряд фирм добавляют в среду налидиксовую кислоту. Известна отечественная коммерческая «селективная питательная среда для выделения псевдомонад,

сухая» также с добавлением цетримидом и налидиксовой кислоты [6].

Для выделения и идентификации НГОБ используют также дифференциально-диагностические среды нового поколения — флюорогенные и хромогенные, позволяющие идентифицировать различные микроорганизмы непосредственно в процессе культивирования на питательных средах на этапе первичного посева. Принцип действия указанных сред основан на выявлении высокоспецифичных ферментов у искомым микроорганизмов. В состав этих сред входит хромогенный субстрат — вещество, при расщеплении которого ферментами, специфичными для определённого вида микроорганизмов, образуются окрашенные и/или флюоресцирующие продукты. В результате колонии искомым микроорганизмов и/или среда окрашиваются в определённый цвет или приобретают способность к флюоресценции при ультрафиолетовом облучении. HiFluoro *Pseudomonas Agar Base* («HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.») предназначена для селективного выделения и идентификации бактерий *P. aeruginosa* из клинического и другого материала флюоресцентным методом. Хромогенная питательная среда BD *Seracia Medium* («Becton Dickinson») применяется для выделения неферментирующих бактерий *Burkholderia cepacia* из клинических образцов.

Таким образом, известные питательные среды зарубежного производства, предназначенные для выделения отдельных видов НГОБ, не обеспечивают возможности одновременного выделения и идентификации нескольких видов НГОБ, особенно при проведении широкомасштабного эпидемиологического мониторинга за ассоциациями штаммов НГОБ, циркулирующими внутри стационаров, к тому же являются дорогостоящими.

Запатентована отечественная дифференциально-диагностическая среда для выделения НГОБ (SU 1351975A1), которая содержит селективный агент — 2,3,5-трифенил-тетразолий хлористый, индикатор (бромтимоловый синий) и позволяет

выделить НГОБ из клинического материала и дифференцировать их от ферментирующих сахара энтеробактерий и протеев [7]. Данная среда, являясь хромогенной, обеспечивает окраску группы НГОБ в бордовый цвет, ферментирующих — в жёлтый, *Proteus mirabilis* формирует колонии чёрного цвета. Однако указанная среда не обеспечивает дифференциацию между отдельными представителями НГОБ.

Целью работы явилось конструирование дифференциально-диагностической среды, содержащей отечественные ингредиенты, позволяющей проводить дифференциацию НГОБ от ферментирующих бактерий и одновременно первичную дифференциацию разных представителей НГОБ по изменению цвета среды и/или колоний бактерий.

Материалы и методы

Состав и способ приготовления предложенной модифицированной питательной среды для выделения и идентификации НГОБ (МодСИ — Модифицированная Среда с Индикатором) защищены патентом на изобретение № 2715329 от 26.02.2020. Среда (рН $7,5 \pm 0,1$) содержит отечественные ингредиенты и имеет следующий состав:

- питательный бульон сухой — 20,0;
- экстракт кормовых дрожжей для микробиологических питательных сред — 1,0;
- Д-глюкоза — 1,0;
- Д-галактоза — 20,0;
- натрия хлорид — 5,0;
- натрий серноватисто-кислый (тиосульфат натрия) — 0,3;
- натрий углекислый — 0,5;
- натрий сернистокислый — 0,5;
- феноловый красный — 0,05;
- бромтимоловый синий — 0,05;
- кальций углекислый — 5,0;
- агар микробиологический — $11,0 \pm 2,0$;
- дистиллированная вода — до 1 л.

Эффективность роста тест-штаммов бактерий (НГОБ, грамотрицательных энтеробактерий, стафилококков) на предложенной среде МодСИ оценивали в сравнении с дифференциально-диагностической средой для выделения НГОБ (SU 1351975A1), питательной средой Эндо и желточно-солевым агаром (ЖСА).

В работе были использованы следующие тест-штаммы бактерий: НГОБ — *Pseudomonas aeruginosa* № 453, *Burkholderia cepacia* № В-7518, *Stenotrophomonas maltophilia* № В-7520; грамотрицательные энтеробактерии — *Escherichia coli* M-17, *Proteus vulgaris* № 869, *Proteus mirabilis* № 878, *Klebsiella pneumoniae* № 63, *Salmonella enterica typhimurium* № 67, *Salmonella enterica enteritidis* № 2269, *Salmonella enterica* Dublin № 1976; грамположительные кокки — *S. aureus* № 209-р, *S. epidermidis* № 136. Указанные тест-штам-

мы выращивали на скошенном мясопептонном агаре 24 ч при 37°C, выросшие колонии смывали стерильным изотоническим раствором 0,85% NaCl, готовили взвесь бактерий по оптическому стандарту мутности 10 МЕ и титровали до содержания 1000 кл/мл. Полученную взвесь культур (0,1 мл) высевали, равномерно распределяя шпателем Дригальского, параллельно на среду МодСИ, дифференциально-диагностическую среду для выделения НГОБ (SU 1351975A1), питательные среды Эндо и ЖСА. Посевы инкубировали 24 ч при 37°C. Определяли эффективность роста тест-штаммов на сопоставляемых питательных средах, их культуральные и морфологические признаки.

Результаты

Поставленная цель была достигнута введением в состав питательной среды двухкомпонентной индикаторной системы (феноловый красный + бромтимоловый синий), обеспечивающей дифференциацию НГОБ от ферментирующих бактерий и одновременно первичную дифференциацию разных представителей НГОБ по изменению цвета колоний и характеру роста. Добавление карбоната кальция предотвращает чрезмерное закисление среды продуктами жизнедеятельности бактерий. Среда содержит отечественные ингредиенты.

В ходе решения этой задачи был проведён подбор количества индикаторов для МодСИ. Индикатор феноловый красный и бромтимоловый синий добавляли в среду МодСИ по 0,025 или 0,05 мл/л. При добавлении в состав среды МодСИ индикаторов по 0,025 мл/л колонии исследуемых тест-штаммов (*P. aeruginosa*, *B. cepacia*, *S. maltophilia*) не отличались друг от друга по цвету (серые колонии). В то же время при добавлении в среду индикаторов в количестве 0,05 мл/л зафиксирована различная окраска колоний тестируемых штаммов: колонии *P. aeruginosa* окрашивались в чёрно-фиолетовый с металлическим блеском цвет, *B. cepacia* — в белые флюоресцирующие колонии, *S. maltophilia* — в серые. Размеры колоний в обоих случаях составляли 1,5–2,0 мм, количество колониеобразующих клеток (КОЕ) на 1 мл также было практически одинаковым, что свидетельствовало о том, что добавление в среду индикаторов не приводило к угнетению роста исследуемых тест-штаммов.

Следующей задачей нашей работы было сравнение эффективности роста тест-штаммов бактерий (НГОБ, грамотрицательных энтеробактерий, стафилококков) на МодСИ и аналоговой дифференциально-диагностической среде для выделения НГОБ (SU 1351975), питательной среде Эндо и ЖСА. В соответствии с патентом на изобретение № 2715329 от 26.02.2020 эффективность роста тест-штаммов бактерий на предлагаемой среде МодСИ в сравнении с дифференциально-диагно-

стической средой по SU 1351975, питательной средой Эндо и ЖСА рассчитывалась по количеству выросших КОЕ и проценту высеваемости на чашках со средой, исходя из количества микробных тел в 1 мл микробной взвеси.

Эффективность роста НГОБ на среде МодСИ составила 91–97 КОЕ/мл (91–97%), что сопоставимо с результатами роста на дифференциально-диагностической среде по SU 1351975A1 — 91–100 КОЕ/мл (91–100%).

Установлена достаточно высокая эффективность роста на среде МодСИ грамотрицательных энтеробактерий — 90–98 КОЕ/мл (90–98%) и стафилококков — 90–92 КОЕ/мл (90–92%), соответствующая показателям роста данных бактерий на среде Эндо для грамотрицательных энтеробактерий и ЖСА для стафилококков. Эти данные могут позволить использовать среду МодСИ для выращивания широкого спектра микроорганизмов.

Далее были изучены дифференциальные свойства среды МодСИ в сравнении с контрольными питательными средами для НГОБ (SU 1351975A1), энтеробактерий (среда Эндо) и стафилококков (ЖСА). Указанные выше штаммы были засеяны на испытываемые питательные среды, выросшие колонии были учтены на следующие сутки. Фиксировался характер роста тест-штаммов на данных средах.

Так, на питательной среде сравнения по SU 1351975A1 рост тест-штаммов НГОБ (*Pseudomonas aeruginosa* № 453, *Burkholderia cepacia* № В-7518, *Stenotrophomonas maltophilia* № В-7520) был однотипным: все культуры давали зелёные с бордовым центром колонии диаметром 1,5–2,0 мм. На среде Эндо *B. cepacia* и *S. maltophilia* были неразличимы — бледно-розовые, 1,5–2,0 мм диаметром. *P. aeruginosa* на среде Эндо давала розовые колонии с ажурным краем, до 4 мм в диаметре. В отличие от сред сравнения, на среде МодСИ все 3 тест-штамма НГОБ давали отличающиеся друг от друга колонии: *P. aeruginosa* — чёрно-фиолетовые с металлическим блеском, 1,5–2,0 мм, *B. cepacia* — нежные белые флюоресцирующие, 1,5–2,0 мм, *S. maltophilia* — серые, 1,5–2,0 мм. Таким образом, на предложенной среде МодСИ можно уже при первичном учёте дифференцировать колонии тест-штаммов НГОБ.

При изучении дифференцирующих свойств среды МодСИ в отношении грамотрицательных энтеробактерий средой сравнения выступала среда Эндо, на которой колонии тест-штаммов *Escherichia coli* M-17, *Proteus vulgaris* № 869, *Proteus mirabilis* № 878, *Klebsiella pneumoniae* № 63 выглядели типично согласно общепринятым описаниям: *E. coli* — малиновые колонии с металлическим блеском, до 4,0 мм в диаметре, *P. vulgaris* и *P. mirabilis* — бледно-розовые полупрозрачные с «роением», от 4 мм и более, *K. pneumoniae* — розовые слизистые, 2–4 мм. На среде МодСИ *E. coli*

давали ярко-жёлтые, 1,5–2,0 мм в диаметре колонии; *P. vulgaris* — розово-фиолетовые, до чёрного, с «роением», 2,0–5,0 мм; *P. mirabilis* — сиреневые с «роением», 1,5–4,0 мм; *K. pneumoniae* — розово-жёлтые, слизистые, 2,0–3,0 мм в диаметре.

Колонии тест-штаммов сальмонелл (*Salmonella enterica typhimurium* № 67, *Salmonella enterica enteritidis* № 2269, *Salmonella enterica Dublin* № 1976) на среде Эндо выглядели однотипно и были неотличимы друг от друга — бледно-розовые, прозрачные, 1,5–2,0 мм в диаметре. На среде МодСИ данные штаммы формировали различные типы колоний: *Salmonella enterica typhimurium* № 67 — розовые с металлическим блеском, 1,5–2,0 мм колонии; *Salmonella enterica enteritidis* № 2269 — жёлтые, 1,5–2,0 мм; *Salmonella enterica Dublin* № 1976 — жёлто-розовые, 1,5–2,0 мм.

Таким образом, все испытываемые штаммы энтеробактерий на разработанной нами среде МодСИ демонстрировали различный тип колоний, что позволяло дифференцировать их друг от друга и от НГОБ.

Золотистые и эпидермальные стафилококки (*S. aureus* № 209-р, *S. epidermidis* № 136) на представленной среде давали, соответственно, жёлтые и белые колонии, 0,5–1,0 мм в диаметре и были явно отличимы от колоний НГОБ и энтеробактерий.

Совместное культивирование смесей тест-штаммов на среде МодСИ показало, что все изученные штаммы высевались на чашках в количествах, соответствующих посевной дозе, колонии сохраняли морфологические признаки, описанные выше.

Обсуждение

Таким образом, на среде МодСИ тест-штаммы НГОБ (*P. aeruginosa*, *B. cepacia*, *S. maltophilia*) отличались по цвету колоний и характеру роста как от тест-штаммов других бактерий (грамотрицательных энтеробактерий, стафилококков), так и между собой.

Из полученных результатов следует, что эффективность роста микроорганизмов, взятых в качестве тест-штаммов, на среде МодСИ высока и составляет в сравнении со средой Эндо 96–100%, с дифференциально-диагностической средой для выделения НГОБ (SU 1351975A1) — 97–100%, со средой ЖСА — 100%, что свидетельствует о возможности использования МодСИ для выращивания широкого спектра микроорганизмов.

Заключение

При оценке дифференцирующих свойств среды МодСИ для выделения и идентификации НГОБ установлено, что предлагаемая среда позволяет по цвету колоний и характеру роста отличить тест-штаммы НГОБ (*P. aeruginosa*, *B. cepacia*, *S. maltophilia*) как от тест-штаммов других бактерий

(грамотрицательных энтеробактерий, стафилококков), так и между собой, что даёт возможность применять разработанную модифицированную питательную среду для дифференциации НГОБ от ферментирующих бактерий и одновременно первичной дифференциации разных представителей НГОБ по изменению цвета среды и различному цвету колоний в лабораторной практике, в том числе при эпидемиологическом мониторинге за ассоциациями штаммов НГОБ, циркулирующих в стационаре.


СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Покровский В.И., Акимкин В.Г., Брико Н.И., Брусина Е.Б., Благодрава А.С., Зуева Л.П. Основы современной классификации инфекций, связанных с медицинской помощью. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2011; (3): 20–5.
2. Аблякимова Л.Х. Роль микробиологического контроля в профилактике инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. *Журнал фундаментальной медицины и биологии*. 2014; (1): 41–5.
3. Зубков М.Н. Неферментирующие бактерии: классификация, Общая характеристика, роль в патологии человека. Идентификация *Pseudomonas* spp. и сходных микроорганизмов. *Инфекции и антимикробная терапия*. 2003; 5(1): 55–9.
4. Шагинян И.А., Чернуха М.Ю. Неферментирующие грамотрицательные бактерии в этиологии внутрибольничных инфекций: клинические, эпидемиологические и микробиологические особенности. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2005; 7(3): 271–85.
5. Маркелова Н.Н., Семёнова Е.Ф., Тутельян А.В. Мониторинг возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*) в стационаре. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2019; 9(2): 68–74. <https://doi.org/10.18565/epidem.2019.9.2.68-74>
6. Храмов М.В., Шепелин А.П., Полосенко О.В., Марчихина И.И., Шолохова Л.П., Мартовецкий М.Н. Селективная питательная среда для выделения псевдомонад, сухая. Патент РФ № 2530549; 2014.
7. Кушиева Т.Г., Мороз А.Ф., Меджидов М.М. Дифференциально-диагностическая среда для выделения неферментирующих грамотрицательных бактерий. Патент РФ № SU1351975A1; 1987.

REFERENCES

1. Pokrovskiy V.I., Akimkin V.G., Briko N.I., Brusina E.B., Blagodarava A.S., Zueva L.P. Bases for the current classification of healthcare-associated infections. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni*. 2011; (3): 20–5. (in Russian)
2. Ablyakimova L.Kh. The role of microbiological control purposes in the prevention of infections, holy associated with the provision of medical assistance. *Zhurnal fundamental'noy meditsiny i biologii*. 2014; (1): 41–5. (in Russian)
3. Zubkov M.N. Non-fermenting bacteria: classification, General characteristics, role in human pathology. Identification of *Pseudomonas* spp. and similar microorganisms. *Infektsii i antimikrobnaya terapiya*. 2003; 5(1): 55–9. (in Russian)
4. Shaginyan I.A., Chernukha M.Yu. Non-fermentative gram-negative bacteria in the etiology of nosocomial infections: clinical, epidemiological and microbiological features. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2005; 7(3): 271–85. (in Russian)
5. Markelova N.N., Semёnova E.F., Tutel'yan A.V. Monitoring the pathogens (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*) of healthcare-associated infections in a hospital. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktual'nye voprosy*. 2019; 9(2): 68–74. <https://doi.org/10.18565/epidem.2019.9.2.68-74>. (in Russian)
6. Khramov M.V., Shepelin A.P., Polosenko O.V., Marchikhina I.I., Sholokhova L.P., Martovetskiy M.N. Selective nutrient medium for the isolation of pseudomonads, dry. Patent RF № 2530549; 2014. (in Russian)
7. Kushieva T.G., Moroz A.F., Medzhidov M.M. Differential diagnostic environment for the isolation of non-fermenting gram-negative bacteria. Patent RF № SU1351975A1; 1987. (in Russian)

Информация об авторах


Алешукина Анна Валентиновна  — д.м.н., рук. лаб. вирусологии, микробиологии и молекулярно-биологических методов исследования Ростовского НИИ микробиологии и паразитологии, Ростов-на-Дону, Россия, aaleshukina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9797-2441>

Голошва Елена Владимировна — к.б.н., в.н.с. лаб. вирусологии, микробиологии и молекулярно-биологических методов исследования Ростовского НИИ микробиологии и паразитологии, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4149-9333>

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 27.07.2022;
принята к публикации 31.09.2022;
опубликована 30.10.2022

Information about the authors

Anna V. Aleshukina  — D. Sci. (Med.), Head, Laboratory of virology, microbiology and molecular biological research methods, Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology, Rostov-on-Don, Russia, aaleshukina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9797-2441>

Elena V. Golosha — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of virology, microbiology and molecular biological research methods, Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4149-9333>

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 27.07.2022;
accepted for publication 31.09.2022;
published 30.10.2022



Сравнительное изучение биологических свойств мутантов вируса гриппа А, полученных с помощью сайт-специфического мутагенеза, и варианта живой гриппозной реассортантной вакцины

Черепович Б.С.¹, Ртищев А.А.¹, Акопова И.И.¹, Борисова О.В.¹, Кост В.Ю.²,
Кутузова Н.М.³, Маркушин С.Г.^{1✉}

¹Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия;

³Московский педагогический государственный университет, Москва, Россия

Аннотация

Цель исследования — сравнительное изучение биологических свойств сайт-специфических мутантов вируса гриппа А и гриппозной реассортантной вакцины.

Материалы и методы. Для изучения генетической стабильности сайт-специфических мутантов штамма A/WSN/33 вируса гриппа А была использована методика температурного стресс-теста, который проводили в культуре клеток Madin–Darby Canine Kidney (MDCK). Иммуногенность изучали путём интраназальной иммунизации мышей исследуемыми вирусами. Титр антител определяли с помощью реакции торможения гемагглютинации и иммуноферментного анализа. Способность вирусов индуцировать интерферон 1-го типа в клетках A549 выявляли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Результаты. Исследована генетическая стабильность сайт-специфических мутантов штамма A/WSN/33 (H1N1) с разным количеством чувствительных к температуре (temperature-sensitive — ts) мутаций в генах, кодирующих белки полимеразного комплекса, при помощи стресс-теста в культуре клеток MDCK. Показано, что мутанты U2 и M26, имеющие, соответственно, 3 и 5 ts-мутаций в генах, кодирующих полимеразные белки, обладают высокой генетической стабильностью. Проведено сравнительное изучение способности мутантов U2 и M26, а также холодоадаптированного (ха) реассортанта индуцировать гуморальный иммунитет при интраназальной иммунизации мышей. Обнаружено, что мутанты способствуют более высокой выработке сывороточных антител, чем ха-реассортант. Изучена способность мутантов U2 и M26, а также ха-реассортанта индуцировать экспрессию интерферонов 1-го типа (α -1, α -2, α -4 и интерферон- β) в культуре клеток A549. Показано, что мутанты в большей степени повышают уровень интерферонов 1-го типа по сравнению с ха-реассортантом.

Заключение. Сайт-специфические мутанты вируса гриппа А, имеющие в полимеразных генах 3 и 5 ts-мутаций, показывают высокий уровень генетической стабильности. Они обладают высокой иммуногенностью и индуцируют более высокий уровень интерферона 1-го типа по сравнению с ха-реассортантом. Это позволяет рассматривать сайт-специфические мутанты U2 и M26 в качестве кандидатов в живые гриппозные вакцины.

Ключевые слова: вирус гриппа, сайт-специфические мутанты, генетическая стабильность, иммуногенность, интерферогенность, живые гриппозные вакцины

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). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (протокол № 6 от 02.04.2018).

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке НИИВС им. И.И. Мечникова.

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

Для цитирования: Черепович Б.С., Ртищев А.А., Акопова И.И., Борисова О.В., Кост В.Ю., Кутузова Н.М., Маркушин С.Г. Сравнительное изучение биологических свойств мутантов вируса гриппа А, полученных с помощью сайт-специфического мутагенеза, и варианта живой гриппозной реассортантной вакцины. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(5):557–564.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-239>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-239>

Comparative study of the biological properties of influenza A virus mutants obtained by site-specific mutagenesis and the live influenza reassortant vaccine variant

Bogdan S. Cherepovich¹, Artem A. Rtishchev¹, Irina I. Akopova¹, Olga V. Borisova¹, Vladimir Y. Kost², Nina M. Kutuzova³, Stanislav G. Markushin^{1✉}

¹I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia;

²Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia;

³Moscow State Pedagogical University, Moscow, Russia

Abstract

The **aim** of study was to carry out comparative investigation of biological properties of site-specific mutants of Influenza A virus and variant of live cold-adapted (CA) influenza reassortant vaccine.

Materials and methods. The genetic stability of site-specific mutants (SSM) of the A/WSN/33 (H1N1) strain with ts (temperature sensitive)-mutations in polymerase genes was studied using a stress-test in Madin–Darby Canine Kidney (MDCK) culture. A comparative study of immunogenicity of U2 and M26 mutants with the high genetic stability and the CA-reassortant with similar surface proteins was carried out. The increase in the antibody titer was investigated using enzyme-linked immunosorbent assay and the reaction of delayed hemagglutination. Ability of the studied viruses to induce type 1 interferon in A549 cells was determined using real-time polymerase chain reaction (real-time PCR).

Results. It was shown that U2 and M26 mutants, which have 3 ts-mutations or more in polymerase genes have high genetic stability. It was found that U2 and M26 mutants induced a higher antibody titers than the CA reassortant in mice following the intranasal immunization. The ability of site-specific mutants and CA reassortant to induce type 1 interferon was also investigated. Mutants U2 and M26 increased the level of interferon to a greater extent than the CA-reassortant.

Conclusion. The data obtained indicate that SSM U2 and M26 with 3 ts-mutations or more in the genome have a significant level of genetic stability. Mutants U2 and M26 have a higher immunogenicity and a higher ability to induce interferon in comparison with the CA reassortant. These facts allow us to conclude that SSM of the influenza virus with a set of mutations in polymerase genes can be considered as promising candidates for live influenza vaccines.

Keywords: *site-specific mutants, influenza virus, genetic stability, immunogenicity, CA-reassortant, interferonogenicity, live influenza vaccines*

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). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera (protocol No. 6, 4 April, 2018).

Acknowledgement.

Funding source. The study was carried out with the financial support of the I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera.

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

For citation: Cherepovich B.S., Rtishchev A.A., Akopova I.I., Borisova O.V., Kost V.Y., Kutuzova N.M., Markushin S.G. Comparative study of the biological properties of influenza A virus mutants obtained by site-specific mutagenesis and the live influenza reassortant vaccine variant. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(5):557–564.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-239>

Введение

Накопленный к настоящему времени опыт применения холодоадаптированной (ха) живой гриппозной вакцины в России и США продемонстрировал высокую эффективность этого препарата при массовой вакцинации против гриппа, особенно детей. В отличие от инактивированных гриппозных вакцин, живая вакцина способна защитить от инфек-

ции дрейфовыми вариантами вируса гриппа. Классические живые гриппозные вакцины представляют собой reassortants, имеющие гены, кодирующие «внутренние» белки от ха-штаммов — доноров аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), А/Энн Арбор/6/60 (H2N2), А/Краснодар/101/35/59 (H2N2), и гены, кодирующие поверхностные гликопротеины от антигенно-актуальных эпидемических штаммов

вируса гриппа. В последнее время значительный интерес среди исследователей вызывает генно-инженерный подход к получению живых гриппозных вакцин, предполагающий прямое включение заранее известных и охарактеризованных чувствительных к температуре (*temperature-sensitive* — *ts*) мутаций, присутствующих в геноме штаммов-доноров аттенуации, которые в дальнейшем клонируются в геном вирулентного штамма вируса гриппа. Данные литературы свидетельствуют о том, что использование технологии сайт-специфического мутагенеза может значительно продвинуть разработку живых гриппозных вакцин как в медицине, так и в ветеринарии [1–12]. В НИИВС им. И.И. Мечникова была получена большая панель сайт-специфических мутантов (ССМ) вируса гриппа серотипа H1N1 с использованием мультиплазмидной системы на базе плазмид pHW2000, содержащих гены штамма A/WSN/33 (H1N1). Исследование *ts*- и *att* (*attenuated*)-фенотипа полученных мутантов показало их высокий аттенуационный потенциал.

Цель работы — сравнительное изучение свойств двух ССМ — U2 и M26, имеющих *ts*-мутации в генах, кодирующих белки полимеразного комплекса, и ха-реассортанта, полученного по классической технологии и имеющего 6 генов, кодирующих «внутренние» белки от ха-донора аттенуации A/Краснодар/101/35/59 (H2N2), и 2 гена, кодирующих поверхностные белки HA и NA от вирулентного штамма A/WSN/33 (H1N1).

Материалы и методы

Вирусы

Вирулентный штамм A/WSN/33 (H1N1) получен из Государственной коллекции вирусов при НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского. При изучении генетической стабильности использовали группу ССМ, полученных с помощью мультиплазмидной системы на базе плазмид pHW2000, содержащих гены штамма A/WSN/33(H1N1), предоставленной доктором Р. Вебстером (Мемфис, США). Для исследований использовали ССМ U2 и M26, а также ха-реассортант между штаммами A/WSN/33 (H1N1) и A/Краснодар/101/35/59 (H2N2). ССМ U2 имел 3 *ts*-мутации в гене *PB2*, полученные из генома ха-штаммов-доноров A/Энн Арбор/6/60, A/Ленинград/134/17/57 и A/Краснодар/101/35/59. ССМ M26 имел 3 *ts*-мутации в гене *PB1*, полученные от штамма A/Энн Арбор/6/60, 1 *ts*-мутацию в гене *PB2* от штамма A/Краснодар/101/35/59 и 1 *ts*-мутацию в гене *PA* (аминокислотные замены и их позиции указаны в табл. 1).

Клеточные культуры

В работе использовали перевиваемую культуру эпителиальных клеток почки собаки Madin–Dar-

by Canine Kidney (MDCK) и культуру клеток аденокарциномы лёгкого человека A549. Все использованные в работе вирусы и ССМ поддерживали путём пассажей в 9–11-дневных куриных эмбрионах («СГЦ Загорское ЭПХ»).

Изучение генетической стабильности ССМ штамма A/WSN/33

Клеточную культуру MDCK инфицировали исследуемыми вирусами с расчётом коэффициента множественности заражения, равном 0,01 средней эмбриональной инфекционной дозы (ЭИД₅₀) на 0,2 мл на одну клетку тканевой культуры, и инкубировали в диапазоне температур 34–39°C. Через 72 ч супернатанты отбирали из культуры клеток, где наблюдалось цитопатическое действие вируса. У вирусов, присутствующих в этих супернатантах, было исследовано изменение *ts*-фенотипа методом заражения куриных 10-дневных эмбрионов при разных температурах. Поскольку способность к генетическим изменениям, которые вызывали изменение *ts*-фенотипа, могла быть достаточно низкой, а также могла варьировать, эксперименты проводили несколько раз для каждого мутанта. Мутант считался генетически стабильным, если соотношение титров при пороговых значениях температур 38°C/34°C было не ниже 1 : 500 [1].

Таблица 1. ССМ штамма A/WSN/33 (H1N1)

Table 1. Site-specific mutants of the A/WSN/33 (H1N1)

Номер трансфектанта Number of transfectant	Ген Gene	Штамм-донор (H2N2) Donor strain (H2N2)	Аминокислотные замены Amino acid replacement
3	<i>PB1</i>	A/Krasnodar/101/35/59	I147T
4	<i>PB2</i>	A/Ann Arbor/6/60 A/Krasnodar/101/35/59	N265S M290L
21	<i>PB1</i> <i>PA</i>	A/Krasnodar/101/35/59 A/WSN/33 (H1N1)	I147T F658A
13 LAK-2	<i>PB2</i>	A/Krasnodar/101/35/59 A/Leningrad/134/17/57	V290L V478L
14 AAK -2	<i>PB2</i>	A/Ann Arbor/6/60 A/Krasnodar/101/35/59	N265S V290L
15 LAK-2	<i>PB2</i>	A/Ann Arbor/6/60 A/Leningrad/134/17/57	N265S V478L
16 U2	<i>PB2</i>	A/Ann Arbor/6/60 A/Krasnodar/101/35/59, A/Leningrad/134/17/57	N265S V290L V478L
17 M26	<i>PB1</i> <i>PB2</i> <i>PA</i>	A/Ann Arbor/6/60 A/Krasnodar/101/35/59 A/WSN/33 (H1N1)	K391E E581G E457D V290L F658A

Иммунизация мышей

Все эксперименты проведены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 № 755) и «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» от 18.03.1986. На проведение исследования получено разрешение этического комитета НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (протокол № 6 от 02.04.2018). Беспородные мыши-самки массой 10–12 г получены из питомника РАН «Андреевка». Иммунизацию проводили интраназально под лёгким эфирным наркозом вирусами в инфекционном титре $10^{5.0}$ ЭИД₅₀/0,2 мл в дозе 50 мкл на мышью, вторая иммунизация была через 21 день после первой. Забор крови у мышей производили через 21 день после 1-й иммунизации и через 10 дней после 2-й иммунизации. В эксперименте было 4 группы животных по 12 особей. Первую группу иммунизировали мутантом U2, 2-ю — мутантом M26, 3-ю — ха-реассортантом, 4-ю (контрольную) — физиологическим раствором.

Иммуноферментный анализ

В работе использовали общелабораторные и химические реагенты: 3,3'-, 5,5'-тетраметилбензидин, компоненты буферных растворов («Sigma», «Fluka», «Хеликон»). Для приготовления растворов брали деионизованную воду («Milli-Q System», «Millipore»). Для иммуноферментного анализа (ИФА) использовали прозрачные полистироловые 96-луночные планшеты («Corning-Costar») с иммобилизованными препаратами вируса гриппа. В лунки планшета вносили по 100 мкл сывороток крови иммунизированных мышей и мышей контрольной группы в разведении от 1 : 400 до 1 : 409 600, выдерживали на шейкере при 37°C, скорости вращения 700 об/мин в течение 60 мин. Каждый образец анализировали в 2 лунках. После отмывки в лунки планшета вносили по 100 мкл антител кролика к иммуноглобулинам мыши, конъюгированных с пероксидазой (A 9044, «Sigma») и повторяли этап инкубации. Затем вносили по 100 мкл 33 мМ цитратного буферного раствора pH 4,0, содержащего 0,01% перекиси водорода и 0,5 мМ 3,3'-, 5,5'-тетраметилбензидина. Через 15 мин реакцию останавливали добавлением 100 мкл 0,5 М серной кислоты, измеряли оптическую плотность в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения 680 нм.

Результаты выявления антител в ИФА представляли в виде титров, которые определяли как последнее разведение образца, в котором $OP_{образца} \geq OP_{cp,K} \times 2$, где $OP_{cp,K}$ — среднее арифметическое значение регистрируемого сигнала для образцов контрольной группы.

Реакция торможения гемагглютинации

Реакцию торможения гемагглютинации (РТГА) проводили согласно Методическому указанию МУ 3.3.2.1758-03 «Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа» (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 28.09.2003). В качестве антигенов в РТГА использовали мутант U2, мутант M26 и ха-реассортант. Для постановки РТГА сыворотки прогревали в течение 30 мин при 56°C для разрушения термолабильных ингибиторов. Результаты выявления антител в РТГА представляли в виде титров, которые определяли как последнее разведение образца сыворотки, при котором отсутствовала агглютинация эритроцитов.

Сравнительное изучение интерферогенности мутантов U2, M26 и ха-реассортанта

Монослой клеток A549 инфицировали вирусами с расчётом коэффициента множественности заражения, равного 0,01 ЭИД₅₀/0,2 мл на одну клетку тканевой культуры, и инкубировали 16 ч в CO₂-инкубаторе. Далее проводили выделение РНК из клеточной культуры при помощи набора «diaGene» («Диаэм»). Для получения кДНК использовали набор реактивов «MMLV RT kit» («Евроген»). Далее проводили полимеразную цепную реакцию в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием праймеров к последовательностям генов, кодирующих интерфероны 1-го типа. Результаты ПЦР-РВ анализировали с помощью программного обеспечения «Microsoft Office Excel 2013». Уровень экспрессии, показывающий, во сколько раз большую экспрессию имеют исследуемые образцы по сравнению с контрольным, неинфицированным образцом, оценивали по формуле:

$$\text{Нормализованная степень экспрессии} = 2^{-\Delta\Delta CT},$$

где $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{(\text{инфицированный образец})} -$

$\Delta CT_{(\text{неинфицированный образец})}$;

$\Delta CT = CT_{(\text{исследуемого гена})} - CT_{(\text{гена } \beta\text{-актин})}$.

Процесс нормализации экспрессии исследуемого гена с референсным геном компенсирует любые различия в количествах взятых на анализ образцов биологического материала.

Статистический анализ

Данные, полученные в ИФА и РТГА, анализировали с помощью программного обеспечения «Prism 9» и «GraphPad Software». Результаты для каждой группы экспериментальных животных выражали как среднее арифметическое титра \pm стандартное отклонение (σ). Критерий Манна–Уитни использовали для сравнения результатов, полученных для разных условий эксперимента. Величина $p < 0,05$ рассматривалась как статистически значимая.

Результаты

Генетическая стабильность

Генетическая стабильность вакцинных вариантов вируса гриппа является важнейшим условием их безопасного использования для иммунизации людей. В этой связи мы исследовали генетическую стабильность группы полученных нами ССМ штамма А/WSN/33 (H1N1), имеющих различное количество ts-мутаций в генах, кодирующих белки полимеразного комплекса, с помощью температурного стресс-теста [1]. Данный тест предварительно был успешно использован для изоляции ts-ревертантов из популяции кандидатов в живые гриппозные вакцины [13, 14]. Данные по генетической стабильности, полученные после заражения клеточной культуры MDCK вакцинными вариантами вируса гриппа, представлены в **табл. 2**. У исследуемых вирусов, имеющих в геноме одиночные или двойные мутации, наблюдалось резкое изменение ts-фенотипа. В частности, после стресс-теста соотношение титров при пороговых значениях температур 38°C/34°C наблюдалось у мутанта ААК-2 не выше 1 : 30, у мутанта ААЛ-2 — не выше 1 : 10, у мутанта ЛАК-2 — не выше 1 : 3. Однако у мутантов U2 и M26, имеющих большее количество ts-мутаций в геноме, не наблюдалось значительных изменений ts-фенотипа. Соотношение титров при shutoff 38°C/34°C сохранялось в пределах 1 : 3000–1 : 4000, что свидетельствует о высокой генетической стабильности этих вариантов.

Иммуногенность

Проведено сравнительное изучение способности ССМ U2 и M26, а также ха-реассортанта индуцировать гуморальный иммунитет путём интраназальной иммунизации мышей исследуемыми вирусами.

На **рис. 1** и **рис. 2** представлены результаты, полученные в РТГА и ИФА. Результаты свидетельствуют о том, что как после 1-й, так и после 2-й иммунизации ССМ способствовали более высокой выработке сывороточных антител, чем ха-реассортант. Наиболее отчётливо эта разница проявилась в результатах ИФА. По сравнению с ха-реассортантом мутант M26 показал в 4 и 8 раз больший титр после 1-й и 2-й иммунизаций соответственно; для мутанта U2 наблюдалась разница в 2 и 4 раза ($p < 0,01$).

Сравнительное изучение интерферогенности

Исследована способность ССМ U2 и M26, а также ха-реассортанта индуцировать интерфероны 1-го типа, а именно: α -1, α -2, α -4 и β в клеточной культуре A549. ССМ способствовали повышению интерферона 1-го типа в большей степени, чем ха-реассортант (**рис. 3**). Мутанты U2 и M26 индуцировали α -1 в 2,2 и 3,6 раза соответственно больше по сравнению с контролем. В свою очередь экспрессия интерферона- β показала превышение в 11,3 и 15,4 раза над контролем для мутантов U2 и M26 соответственно, что является наибольшим значением для группы исследуемых интерферонов.

Обсуждение

Генетическая стабильность вакцинных вариантов вируса гриппа является важнейшим условием их безопасного использования для иммунизации населения. У мутантов U2 и M26 после проведения температурного стресс-теста не наблюдалось изменения ts-фенотипа. Соотношение титров при пороговых значениях температур 38°C/34°C у данных мутантов свидетельствует об их высокой генетической стабильности. Как показали результаты срав-

Таблица 2. Изучение генетической стабильности ССМ штамма А/WSN/33, имеющих ts-мутации в генах, кодирующих белки полимеразного комплекса

Table 2. Study of the genetic stability of site-specific mutants of strain A/WSN/33 with ts-mutations in the genes encoding proteins of the polymerase complex

Исследуемые вирусы Researched viruses	ts-Фенотип мутантов до проведения стресс-теста, lg ЭИД ₅₀ /0,2 мл ts-Phenotype of mutants before the stress test, lg EID ₅₀ /0,2 ml			ts-Фенотип после проведения стресс-теста, lg ЭИД ₅₀ /0,2 мл ts-Phenotype after stress test, lg EID ₅₀ /0,2 ml		
	34°C	38°C	39°C	34°C	38°C	39°C
Исходный штамм Original strain A/WSN/33 (H1N1)	6,5 ± 0,3	6,5 ± 0,2	6,2 ± 0,4	6,5 ± 0,4	6,5 ± 0,8	6,2 ± 0,4
AAL-2	6,5 ± 0,4	3,5 ± 0,5	< 1,0	4,5 ± 0,8	3,5 ± 0,7	1,5 ± 0,5
AAK-2	5,5 ± 0,5	3,5 ± 0,4	< 1,0	5,0 ± 0,5	3,5 ± 0,4	2,0 ± 0,4
ЛАК-2	6,5 ± 0,5	3,0 ± 0,3	< 1,0	5,5 ± 0,2	5,0 ± 0,5	2,5 ± 0,2
U-2	6,5 ± 0,3	2,0 ± 0,4	< 1,0	4,5 ± 0,5	1,0 ± 0,5	< 1,0
M26	6,0 ± 0,5	2,0 ± 0,4	< 1,0	6,0 ± 0,4	2,0 ± 0,3	< 1,0
Трансфектант № 3 Transfectant No. 3	6,5 ± 0,3	3,0 ± 0,3	< 1,0	6,0 ± 0,5	5,5 ± 0,4	2,0 ± 0,4
Трансфектант № 4 Transfectant No. 4	5,5 ± 0,6	3,0 ± 0,5	< 1,0	5,5 ± 0,5	3,5 ± 0,4	1,0 ± 0,5

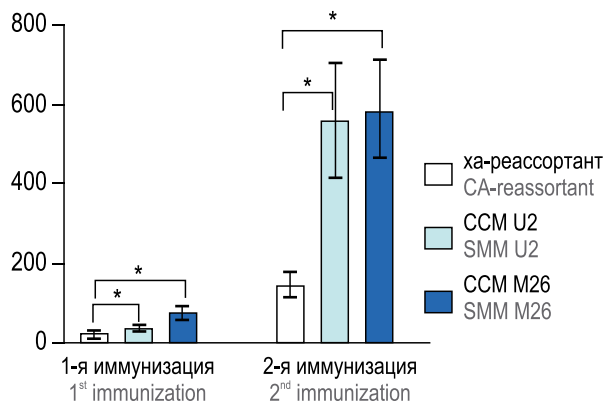


Рис. 1. Титры антител ССМ и ха-реассортанта в РТГА после интраназальной иммунизации.

* $p < 0,01$.

Fig. 1. Antibody titers induced by site-specific mutants (SSM) and CA reassortant in the hemagglutination inhibition assay after intranasal immunization.

* $p < 0.01$.

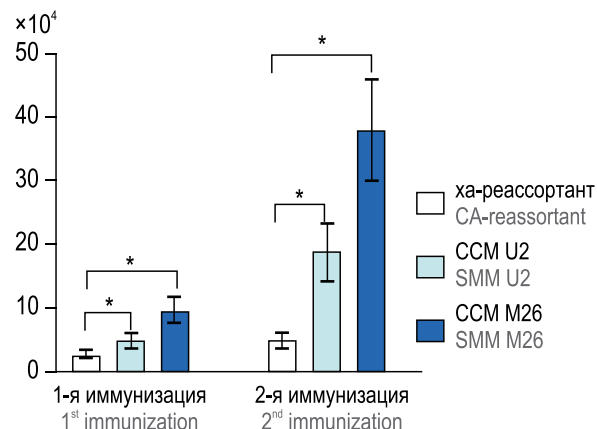


Рис. 2. Титры антител ССМ и ха-реассортанта в ИФА после интраназальной иммунизации.

* $p < 0,01$.

Fig. 2. Antibody titers induced by site-specific mutants (SSM) and CA reassortant in enzyme immunoassay after intranasal immunization.

* $p < 0.01$.

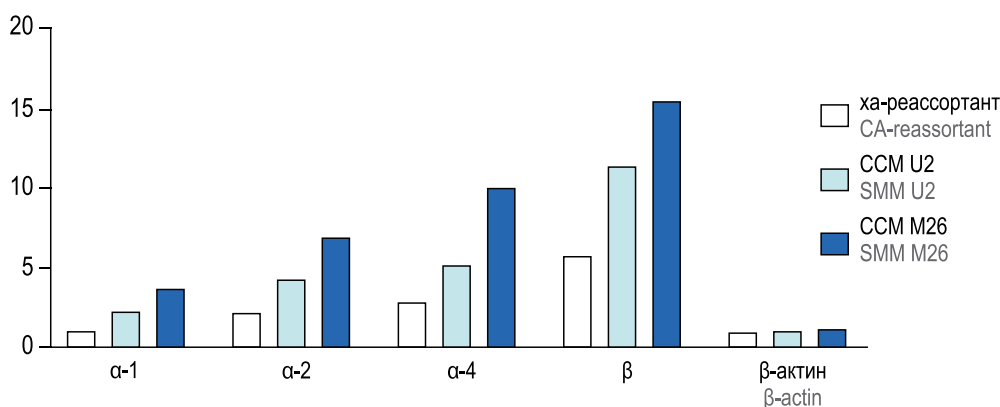


Рис. 3. Влияние ССМ и ха-реассортанта на способность индуцировать интерферон α-1, α-2, α-4 и β клетками карциномы лёгочной ткани человека A549.

Fig. 3. Effect of site-specific mutants (SSM) and CA reassortant on the ability to induce interferon α-1, α-2, α-4 and β by A549 human lung tissue carcinoma cells.

нительного изучения иммуногенности ССМ U2, M26 и ха-реассортанта, ССМ способствовали более высокой выработке сывороточных антител, чем ха-реассортант. Интересно отметить способность мутанта M26 индуцировать более высокие титры сывороточных антител по сравнению с мутантом U2 в ИФА, в то же время в РТГА наблюдались одинаковые титры сывороточных антител для ССМ после 2-й иммунизации. Можно предположить, что мутант M26 в результате иммунизации приводит к синтезу большого количества дефектного белка. Антитела, образуемые в ответ на синтез дефектного белка, теряют способность к нейтрализации в РТГА, однако в ИФА продолжают детектироваться.

Сравнительное изучение интерферогенности исследуемых вирусов показало, что ССМ U2 и M26 способствуют повышению уровня интерферонов 1-го типа в клетках A549 в большей степени,

чем ха-реассортант, что свидетельствует о более активной стимуляции мутантами клеточного иммунитета. Ранее мы показали высокую защитную эффективность данных ССМ вируса гриппа при гомологичном и гетерологичном контрольном заражении [11]. Полученные нами данные позволяют сделать вывод о том, что ССМ вируса гриппа типа А серотипа H1N1, обладающие соответствующим набором ts-мутаций в генах, кодирующих белки полимеразного комплекса, можно рассматривать как кандидаты в живые гриппозные вакцины.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Parkin N.T., Chiu P., Coelingh K. Genetically engineered live attenuated influenza A virus vaccine candidates. *J. Virol.* 1997; 71(4): 2772–8. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.4.2772-2778.1997>
2. Subbarao E.K., Park E.J., Lawson C.M., Chen A.Y., Murphy B.R., et al. Sequential addition of temperature-sensitive

- missense mutations into the PB2 gene of influenza A transfectant viruses can effect an increase in temperature sensitivity and attenuation and permits the rational design a genetically engineered live influenza A virus vaccine. *J. Virol.* 1995; 69(10): 5969–77. <https://doi.org/10.1128/jvi.69.10.5969-5977.1995>
3. Broadbent A.J., Santos C.P., Godbout R.A., Subbarao K. The temperature-sensitive and attenuation phenotypes conferred by mutations in the influenza virus PB2, PB1 and NP genes are influenced by the species of origin of the PB2 gene in reassortant viruses derived from Influenza A/California/07/2009 and A/WSN/33 viruses. *J. Virol.* 2014; 88(21): 12339–47. <https://doi.org/10.1128/jvi.02142-14>
4. Song H., Nieto G.R., Perez D.R. A new generation of modified live attenuated avian influenza viruses using a two-strategy combination as potential vaccine candidates. *J. Virol.* 2007; 81(17): 9238–48. <https://doi.org/10.1128/jvi.00893-07>
5. Hickman D., Hossain M.J., Song H., Araya Y., Solórzano A., Perez D.R. An avian live attenuated master backbone for potential use in epidemic and pandemic influenza vaccines. *J. Gen. Virol.* 2008; 89(Pt. 11): 2682–90. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/004143-0>
6. Solórzano A., Ye J., Pérez D.R. Alternative live-attenuated influenza vaccines based on modifications in the polymerase genes protect against epidemic and pandemic flu. *J. Virol.* 2010; 84(9): 4587–96. <https://doi.org/10.1128/jvi.00101-10>
7. Pena L., Vincent A.L., Ye J., Ciacci-Zanella J.R., Angel M., Lorusso A., et al. Modifications in the polymerase genes of a swine-like triple-reassortant influenza virus to generate live attenuated vaccines against 2009 pandemic H1N1 viruses. *J. Virol.* 2011; 85(1): 456–69. <https://doi.org/10.1128/jvi.01503-10>
8. Pena L., Sutton T., Chockolingam M., Kumar S., Angel M., Shao H., et al. Influenza viruses with rearranged genomes as live-attenuated vaccines. *J. Virol.* 2013; 87(9): 5118–27. <https://doi.org/10.1128/jvi.02490-12>
9. Zhou B., Li Y., Speer S.D., Subba A., Lin X., Wentworth D.E. Engineering temperature sensitive live attenuated influenza vaccines from emerging viruses. *Vaccine.* 2012; 30(24): 3691–792. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.03.025>
10. Kost V., Tsfasman T., Terekhov A., Koptiaeva I.B., Lisovskaya K.V., Markushin S. Attenuation of the cold-adapted (CA) A/Krasnodar/101/35/59 (H2N2) influenza strain. Role of the 147Thr mutation in the PB1 gene. *Int. J. Sci. Res. Methodol.* 2017; 6(2): 96–114.
11. Tsfasman T., Kost V.Y., Markushin S., Koptyaeva I.B., Akopova I.I., Lisovskaya K.V., et al. Investigation of efficiency of site-specific mutants of the influenza virus in homological and heterologous control infection. *EC Microbiology.* 2017; 12(5): 232–42.
12. Markushin S.G., Rtishchev A.A. Creation of live influenza vaccines with the use of site -specific mutagenesis. *Biol. Bull. Rev.* 2017; 7(4): 323–32.
13. Murphy B.R., Tolpin M.D., Massicot J.G., Kim H.Y., Parrott R.H., Chanock R.M. Escape of a mutant from its temperature sensitive phenotype by extragenic suppression and other types of mutation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1980; 354: 172–82. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1980.tb27966.x>
- 71(4): 2772–8. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.4.2772-2778.1997>
2. Subbarao E.K., Park E.J., Lawson C.M., Chen A.Y., Murphy B.R., et al. Sequential addition of temperature-sensitive missense mutations into the PB2 gene of influenza A transfectant viruses can effect an increase in temperature sensitivity and attenuation and permits the rational design a genetically engineered live influenza A virus vaccine. *J. Virol.* 1995; 69(10): 5969–77. <https://doi.org/10.1128/jvi.69.10.5969-5977.1995>
3. Broadbent A.J., Santos C.P., Godbout R.A., Subbarao K. The temperature-sensitive and attenuation phenotypes conferred by mutations in the influenza virus PB2, PB1 and NP genes are influenced by the species of origin of the PB2 gene in reassortant viruses derived from Influenza A/California/07/2009 and A/WSN/33 viruses. *J. Virol.* 2014; 88(21): 12339–47. <https://doi.org/10.1128/jvi.02142-14>
4. Song H., Nieto G.R., Perez D.R. A new generation of modified live attenuated avian influenza viruses using a two-strategy combination as potential vaccine candidates. *J. Virol.* 2007; 81(17): 9238–48. <https://doi.org/10.1128/jvi.00893-07>
5. Hickman D., Hossain M.J., Song H., Araya Y., Solórzano A., Perez D.R. An avian live attenuated master backbone for potential use in epidemic and pandemic influenza vaccines. *J. Gen. Virol.* 2008; 89(Pt. 11): 2682–90. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/004143-0>
6. Solórzano A., Ye J., Pérez D.R. Alternative live-attenuated influenza vaccines based on modifications in the polymerase genes protect against epidemic and pandemic flu. *J. Virol.* 2010; 84(9): 4587–96. <https://doi.org/10.1128/jvi.00101-10>
7. Pena L., Vincent A.L., Ye J., Ciacci-Zanella J.R., Angel M., Lorusso A., et al. Modifications in the polymerase genes of a swine-like triple-reassortant influenza virus to generate live attenuated vaccines against 2009 pandemic H1N1 viruses. *J. Virol.* 2011; 85(1): 456–69. <https://doi.org/10.1128/jvi.01503-10>
8. Pena L., Sutton T., Chockolingam M., Kumar S., Angel M., Shao H., et al. Influenza viruses with rearranged genomes as live-attenuated vaccines. *J. Virol.* 2013; 87(9): 5118–27. <https://doi.org/10.1128/jvi.02490-12>
9. Zhou B., Li Y., Speer S.D., Subba A., Lin X., Wentworth D.E. Engineering temperature sensitive live attenuated influenza vaccines from emerging viruses. *Vaccine.* 2012; 30(24): 3691–792. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.03.025>
10. Kost V., Tsfasman T., Terekhov A., Koptiaeva I.B., Lisovskaya K.V., Markushin S. Attenuation of the cold-adapted (CA) A/Krasnodar/101/35/59 (H2N2) influenza strain. Role of the 147Thr mutation in the PB1 gene. *Int. J. Sci. Res. Methodol.* 2017; 6(2): 96–114.
11. Tsfasman T., Kost V.Y., Markushin S., Koptyaeva I.B., Akopova I.I., Lisovskaya K.V., et al. Investigation of efficiency of site-specific mutants of the influenza virus in homological and heterologous control infection. *EC Microbiology.* 2017; 12(5): 232–42.
12. Markushin S.G., Rtishchev A.A. Creation of live influenza vaccines with the use of site -specific mutagenesis. *Biol. Bull. Rev.* 2017; 7(4): 323–32.
13. Murphy B.R., Tolpin M.D., Massicot J.G., Kim H.Y., Parrott R.H., Chanock R.M. Escape of a mutant from its temperature sensitive phenotype by extragenic suppression and other types of mutation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1980; 354: 172–82. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1980.tb27966.x>

REFERENCES

Информация об авторах

Черепович Богдан Сергеевич — м.н.с. лаб. РНК-содержащих вирусов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5803-6263>

Ртищев Артём Андреевич — м.н.с. лаб. РНК-содержащих вирусов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4212-5093>

Акопова Ирина Ивановна — в.н.с. лаб. РНК-содержащих вирусов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1795-4356>

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

Кост Владимир Юрьевич — н.с. лаб. молекулярной токсикологии ИБХ РАН им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1703-2685>

Кутузова Нина Михайловна — д.б.н., профессор, зав. каф. биохимии, молекулярной биологии и генетики МПГУ, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5963-9525>

Маркушин Станислав Георгиевич[✉] — д.м.н., зав. лаб. генетики РНК-содержащих вирусов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, s.g.markushin@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0994-5337>

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 13.06.2022;
принята к публикации 12.08.2022;
опубликована 30.10.2022

Information about the authors

Bogdan S. Cherepovich — junior researcher, Laboratory of RNA viruses, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5803-6263>

Artem A. Rtishchev — junior researcher, Laboratory of RNA viruses, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4212-5093>

Irina I. Akopova — leading researcher, Laboratory of RNA viruses, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1795-4356>

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

Vladimir Y. Kost — researcher, Laboratory of molecular toxicology, Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1703-2685>

Nina M. Kutuzova — D. Sci. (Biol.), Professor, Head, Department of biochemistry, molecular biology and genetics, Moscow State Pedagogical University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5963-9525>

Stanislav G. Markushin[✉] — D. Sci. (Med.), Head, Laboratory of genetics of RNA-containing viruses, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, s.g.markushin@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0994-5337>

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 13.06.2022;
accepted for publication 12.08.2022;
published 30.10.2022



Диагностическое значение рецепторов TLR2 и TLR4 на лимфоидных клетках как маркера прогрессирования воспаления пародонта, ассоциированного с ключевыми пародонтопатогенными видами *F. alocis* и *P. gingivalis*

Царев В.Н.¹, Николаева Е.Н.¹, Ипполитов Е.В.¹, Царева Т.В.¹,
Подпорин М.С.¹, Балмасова И.П.^{1,2}

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

²Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

Аннотация

Цель работы — оценка диагностического значения экспрессии TLR2 и TLR4 на лимфоидных клетках пародонта и периферической крови методом иммунофлюоресцентной микроскопии у больных хроническим пародонтитом (ХП), ассоциированным с ключевыми пародонтопатогенными видами *Fillifactor alocis* и *Porphyromonas gingivalis*.

Материалы и методы. В исследование были включены 150 пациентов — 88 (59%) женщин и 62 (41%) мужчины в возрасте 18–73 лет с ХП в фазе обострения и 32 человека без признаков ХП. Для подтверждения диагноза пародонтита использовали набор для полимеразной цепной реакции (ПЦР) «МультиДент-5» (выявление *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*), а также rt-PCR — для *F. alocis* и *P. gingivalis* в содержимом пародонтального кармана. Для оценки клеток, несущих маркеры CD282 и CD284, использовали смывы десневой жидкости из пародонтального кармана раствором Хенкса. Выделенные клетки окрашивали антителами к маркерам CD282 (соответствует рецептору TLR2) или CD284 (соответствует рецептору TLR4), меченными изотиоцианатом флуоресцеина, и фиксировали параформальдегидом для последующей иммунофлюоресцентной микроскопии.

Результаты. Изучена экспрессия TLR2 и TLR4 на лейкоцитах периферической крови и десневой жидкости у людей со здоровым пародонтом и больных ХП, ассоциированным с *F. alocis* и *P. gingivalis*. По результатам ПЦР частота выявления *F. alocis* и *P. gingivalis* составила 64 и 62,7% соответственно, что подтверждало их доминирование в микробной ассоциации. Установлено, что экспрессия TLR2 и TLR4 на лимфоидных клетках периферической крови у людей варьировала. Обсуждается возможное диагностическое значение этого феномена при оценке прогрессирования ХП.

Заключение. У больных ХП, ассоциированным с доминированием пародонтопатогенных видов *F. alocis* и *P. gingivalis*, выявлена разнонаправленная экспрессия TLR2 и TLR4 на клетках периферической крови, которая может иметь диагностическое значение при оценке прогрессирования заболеваний пародонта.

Ключевые слова: TLR1, TLR2, пародонт, пародонтит, *F. alocis*, *P. gingivalis*

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Межвузовским комитетом по этике (протокол № 06-17 от 15.06.2017).

Благодарность. В работе была использована инфраструктура Уникальной научной установки «Трансгенбанк» (НИИ биологии гена РАН).

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: Царев В.Н., Николаева Е.Н., Ипполитов Е.В., Царева Т.В., Подпорин М.С., Балмасова И.П. Диагностическое значение рецепторов TLR2 и TLR4 на лимфоидных клетках как маркера прогрессирования воспаления пародонта, ассоциированного с ключевыми пародонтопатогенными видами *F. alocis* и *P. gingivalis*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(5):565–572.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-336>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-336>

Diagnostic significance of TLR2 and TLR4 receptors on lymphoid cells as a marker of the progression of periodontal inflammation associated with key periodontal pathogenic species *F. alocis* and *P. gingivalis*

Victor N. Tsarev¹, Elena N. Nikolaeva¹, Evgeniy V. Ippolitov¹, Tatyana V. Tsareva¹, Mikhail S. Podporin¹, Irina P. Balmasova^{1,2}

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

²Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

Abstract

The **aim** of the work was to evaluate the diagnostic value of TLR2 and TLR4 expression on periodontal and peripheral blood lymphoid cells by immunofluorescence microscopy in patients with chronic periodontitis associated with key periodontal pathogenic species *Filifactor alocis*, *Porphyromonas gingivalis*.

Materials and methods. The study included 150 patients — 88 (59%) women and 62 (41%) men aged 18 to 73 years with chronic periodontitis in the acute phase (CP) and 32 people without signs of chronic periodontal inflammation. To confirm the diagnosis of periodontitis, the Multident-5 PCR kit was used (detection of *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*), as well as rt-PCR for *F. alocis* and *P. gingivalis* in the contents of the periodontal pocket (NPF GenLab, Russia). To evaluate cells carrying CD282 and CD284 markers, gingival fluid flushes from the periodontal pocket with Hanks' solution were used. The isolated cells were stained with antibodies to CD282 markers (corresponding to TLR2 receptor) or CD284 (corresponding to TLR4 receptor) labeled with FITC, and fixed with paraformaldehyde for subsequent immunofluorescence microscopy.

Results. The expression of TLR2 and TLR4 on peripheral blood and gingival fluid leukocytes was studied in individuals with healthy periodontitis and patients with chronic periodontitis associated with *F. alocis*, *P. gingivalis*. According to the results of PCR, the detection rate of *F. alocis* and *P. gingivalis* was 64 and 62.7%, respectively, which confirmed their dominance in the microbial association. It was found that the expression of TLR2 and TLR4 on peripheral blood lymphoid cells varied in humans. The possible diagnostic significance of this phenomenon in assessing the progression of chronic periodontitis is discussed.

Conclusion. In patients with chronic periodontitis associated with the dominance of periodontopathogenic species *F. alocis*, *P. gingivalis*, the multidirectional expression of TLR2 and TLR4 on peripheral blood cells was observed, which may have diagnostic significance in assessing the progression of periodontal diseases.

Keywords: TLR1, TLR2, periodontium, periodontitis, *F. alocis*, *P. gingivalis*

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Intercollegiate Ethics Committee (protocol No. 06-17, June 15, 2017).

Acknowledgment. The study was carried out using the unique scientific facility Transgenebank (The Institute of Gens Biology, RAN).

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: Tsarev V.N., Nikolaeva E.N., Ippolitov E.V., Tsareva T.V., Podporin M.S., Balmasova I.P. Diagnostic significance of TLR2 and TLR4 receptors on lymphoid cells as a marker of the progression of periodontal inflammation associated with key periodontal pathogenic species *F. alocis* and *P. gingivalis*. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(5):565–572. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-336>

Введение

Хронический пародонтит (ХП) начинается с последовательной колонизации слизистой оболочки полости рта и дёсен пародонтопатогенными бактериями, индуцирующими воспалительную реакцию с привлечением факторов врождённого и адаптивного иммунитета, которые, в свою очередь, влияют на микробную биоплёнку десны [1–7]. Распознавание микробов опосредуется Toll-подобными рецепторами (Toll-like receptors — TLR), которые

взаимодействуют с консервативными патоген-ассоциированными молекулярными паттернами. Установлено, что распознавая определённые паттерны, TLR, в частности TLR-2 и TLR-4, взаимодействуют с большинством пародонтопатогенных видов бактерий [2, 8–10].

В последние годы уделяется большое внимание TLR как факторам врождённого иммунитета. Универсальность механизмов, обусловленная как широким представительством данных маркеров на разнообразных

клетках организма, так и широким спектром лигандов для них, определяет включение TLR в патогенетические звенья развития многих инфекционно-воспалительных заболеваний [9, 10]. Среди основных процессов следует назвать нарушения экспрессии TLR и распознавания лигандов, трансдукции сигналов, выработки эффекторных молекул, а также полиморфизм генов TLR [5, 11]. Дефекты молекул, участвующих в трансдукции сигнала от TLR, по-видимому, лежат в основе повышенной восприимчивости к инфекционным болезням [11].

В исследованиях роли TLR при заболеваниях пародонта, в том числе связанных с системными эффектами пародонтопатогенных бактерий [12, 13], показано проявление этих нарушений при атеросклерозе, инфекционных, аутоиммунных, аллергических и некоторых других заболеваниях [10, 14–16]. Ведущую роль в запуске системных эффектов пародонтопатогенных бактерий играет ассоциация основного возбудителя *Porphyromonas gingivalis* и нового, недавно открытого благодаря технологиям метагеномного анализа и претендующего на ключевую роль — *Filifactor alocis* [9, 17].

Значимость этих механизмов для широкой клинической практики определяет необходимость внедрения адекватных и надёжных методов оценки компонентов системы TLR, которые могут быть воспроизведены в условиях клинической лаборатории лечебно-профилактических учреждений.

Целью работы являлась оценка диагностического значения экспрессии TLR2 и TLR4 на лимфоидных клетках пародонта и периферической крови методом иммунофлюоресцентной микроскопии у больных ХП, ассоциированным с ключевыми пародонтопатогенными видами *F. alocis* и *P. gingivalis*.

Материалы и методы

В исследование были включены 150 пациентов с ХП в фазе обострения, в том числе 88 (59%) женщин и 62 (41%) мужчины, а также 32 человека без признаков ХП (условно здоровые люди). Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Межвузовским комитетом по этике (протокол № 06-17 от 15.06.2017). Возраст обследованных составлял 18–73 года. Пациенты с ХП были разделены на 2 группы по пародонтальным критериям: 1-я группа — ХП средней степени тяжести, 2-я группа — ХП тяжёлой степени с тенденцией к прогрессированию. Пациенты 2-й группы имели рентгенологические признаки выраженной резорбции альвеол челюстных костей.

Для подтверждения диагноза пародонтита проводили мультиплексную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с использованием набора реагентов «МультиДент-5» (НПФ «ГенЛаб») для выявления *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, а также ПЦР с обратной транскрипцией для *F. alocis* и *P. gingivalis* в содержимом пародонтального кармана.

Клетки, несущие маркеры CD282 и CD284, выявляли в смывах десневой жидкости из пародонтального кармана или зубодесневой борозды раствором Хенкса. Выделенные клетки окрашивали антителами к маркерам CD282 (соответствует рецептору TLR2) или CD284 (соответствует рецептору TLR4), меченными FITC, и фиксировали параформальдегидом. Готовые препараты просматривали под микроскопом «ECLIPSE 50i» («Nicon») при увеличении $\times 1000$.

Фенотип лейкоцитов периферической крови определяли с помощью метода проточной лазерной цитофлуориметрии [17]. Для этого к 100 мкл крови добавляли по 10 мкл раствора антител, меченных флюоресцентными многоцветными красителями против TLR2 (TLR2 IgG1 — FITC), CD14 — PE, CD45 — PerCP, CD19 — APC, CD3 — AF700 или TLR4 (TLR4 IgG1 — FITC) и CD14 — PE, CD45 — PerCP, CD19 — APC, CD3 — AF700. В пробирки с негативным контролем добавляли мышинные антитела, меченные FITC (IgG1 — FITC), а также антитела, меченные PE, PerCP, APC и AlexaFluor 700. Инкубировали 30 мин в темноте при 4°C. Для удаления эритроцитов использовали лизирующий буфер FACSLyse («BD Bioscience») в объёме 2 мл в течение 10 мин при комнатной температуре в темноте. Затем проводили центрифугирование при 500g в течение 5 мин. Надосадочную жидкость удаляли. К осаждённым клеткам добавляли по 2 мл фосфатно-солевого буфера. Клеточную взвесь дважды отмывали центрифугированием, после чего лейкоциты ресуспендировали и добавляли 0,5 мл фиксирующего буфера FACS CellFix («BD Bioscience»). Полученные пробы исследовали на проточном цитометре «FACSCanto 2», определяя экспрессию TLR2 и TLR4 на основных субпопуляциях CD3⁺-Т-лимфоцитов, CD19⁺-В-лимфоцитов, CD14⁺-моноцитах и CD45dim-гранулоцитах.

Вероятность различия исследуемых показателей оценивали с помощью критерия *t* Стьюдента. Все расчёты проводили с помощью пакета программ «Statistica 7.0».

Результаты

Результаты молекулярно-биологического исследования, проведённого с помощью ПЦР, показали, что из 150 пациентов с ХП ДНК *P. gingivalis* выявили у 94 (62,7%), *F. alocis* — у 97 (64,7%), в то время как представители других пародонтопатогенов встречались менее чем у 50% пациентов (табл. 1). У 11 (7,3%) пациентов представители данных пародонтопатогенных видов не обнаружены. В контрольной группе частота выявления пародонтопатогенных видов не превышала 8,6% для *P. intermedia* и 11,4% для *F. alocis* и *T. forsythia*. Представители *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. denticola* у пациентов с интактным пародонтом не обнаружены.

Как показали параллельные исследования десневой жидкости у здоровых обследуемых или экссудата пародонтального кармана у пациентов с ХП, проведённые с помощью иммунофлюоресцентной микроскопии, большую часть клеток составляли лейкоциты, которые

Таблица 1. Частота выявления пародонтопатогенных видов бактерий в материале из биоплёнки у больных ХП и пациентов с интактным пародонтом (%)

Table 1. Frequency of detection of periodontal pathogenic bacterial species in biofilm material in patients with chronic periodontal disease and intact periodontium (%)

Виды пародонтопатогенных бактерий Types of periodontopathogenic bacteria	Группа Group		χ^2
	пациенты с ХП patients with chronic periodontal disease (n = 150)	пациенты со здоровым пародонтом patients with healthy periodontium (n = 35)	
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	69* (46,0)	0 (0)	25,677
<i>F. alocis</i>	97* (64,7)	4 (11,4)	32,447
<i>P. gingivalis</i>	94* (62,7)	0 (0)	44,590
<i>P. intermedia</i>	72* (48,0)	3 (8,6)	18,302
<i>T. forsythia</i>	73* (48,7)	4 (11,4)	17,256
<i>T. denticola</i>	52* (34,6)	0 (0)	16,877
Нет бактерий No germs	11* (7,3)	29 (82,9)	95,515

Примечание. * $p < 0,001$ по сравнению с пациентами со здоровым пародонтом.

Note. * $p < 0.001$ compared with the patients with healthy periodontium.

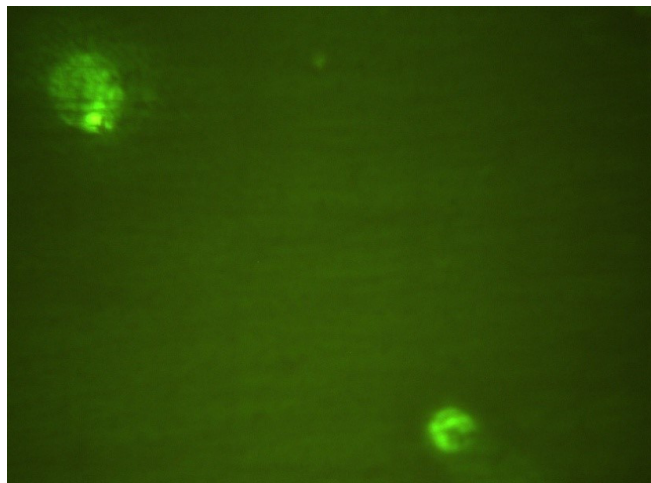


Рис. 1. Клетки десневой жидкости, экспрессирующие CD282.

Окраска FITC, $\times 1000$.

Fig. 1. Gingival fluid cells expressing CD282.

FITC stain, $\times 1000$.

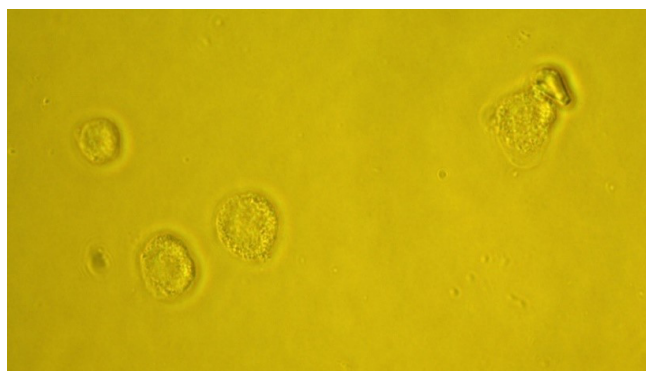


Рис. 2. Клетки десневой жидкости.

Фазовый контраст, $\times 1000$.

Fig. 2. Gingival fluid cells.

Phase contrast, $\times 1000$.

экспрессировали рецепторы врождённого иммунитета TLR2 и TLR4 с различной интенсивностью.

В контрольной группе частота выявления клеток, экспрессирующих эти маркеры, составила $12,3 \pm 3,2\%$, а в группе пациентов с ХП в фазе обострения — $4,1 \pm 2,1\%$ ($p < 0,05$).

На **рис. 1** в поле зрения люминесцентного микроскопа зафиксированы 2 клетки, экспрессирующие CD282 (TLR2), меченные FITC. Видны ярко окрашенные скопления в виде гранул. На **рис. 2** в фазовом контрасте видны 4 клетки, выделенные из экссудата пародонтального кармана. На **рис. 3** при люминесцентном микроскопировании представлены эти же 4 клетки с неярким диффузным окрашиванием CD284-FITC (TLR4). Таким образом, в результате данного пилотного исследования выявлена и визуализирована экспрессия рецепторов врождённого иммунитета TLR2 и TLR4 в десневой жидкости и экссудате пародонтального кармана при ХП.

К сожалению, содержание клеточных элементов в десневой жидкости было меньше, чем требуется для исследования иммунофенотипа клеток на проточном цитометре — $3,5-9,4 \times 10^6$ клеток/мл [17]. При выделе-

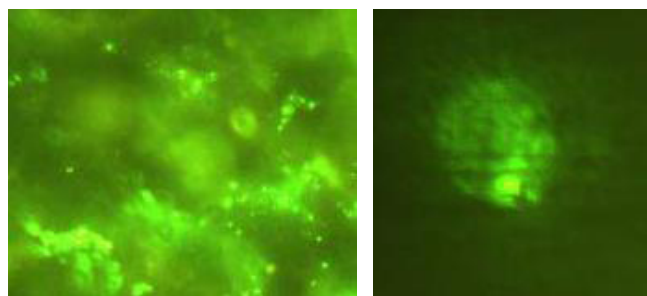


Рис. 3. Клетки десневой жидкости, экспрессирующие CD284.

Окраска FITC, $\times 1000$.

Fig. 3. Gingival fluid cells expressing CD284.

FITC stain, $\times 1000$.

нии клеток из десневой жидкости обычно используют её смывы изотоническим раствором NaCl, которые позволяют получить $5-10 \times 10^3$ клеток/мл, т.е. примерно в 2 раза меньше, чем требуется. Поэтому для получения дополнительных данных проводили исследования на клетках периферической крови.

В первой серии экспериментов определяли экспрессию TLR2 и TLR4 на лейкоцитах, выделенных из периферической крови пациентов с помощью осаждения эритроцитов на 2% желатине в фосфатно-солевом буфере, согласно стандартным методикам, применяемым для определения фенотипа иммунокомпетентных клеток [8].

Полученные данные позволяют утверждать, что экспрессия TLR2 и TLR4 на лейкоцитах периферической крови у разных людей независимо от группы, к которой они принадлежали, значительно варьировала от полного отсутствия до 100% экспрессии на моноцитах крови некоторых людей. На **рис. 4** и **рис. 5** представлены примеры определения маркеров CD14/CD282 и CD3/CD284 на нейтрофилах, лимфоцитах и моноцитах периферической крови.

Экспрессия TLR2 на моноцитах (двойное окрашивание CD14/CD282) и TLR4 на лимфоцитах (двойное окрашивание CD3/CD284) была очень низкой и не превышала 1%.

Во второй серии экспериментов клетки цельной крови одновременно окрашивали с помощью нескольких антител против определённых популяций лейкоцитов, меченных различными флуоресцентными метками. В данной модификации иммунофенотипирования клетки субпопуляций не теряются, что обычно происходит при выделении лейкомаксы из периферической крови. Тем не менее доля клеток, экспрессирующих CD282 (TLR2), также была невысокой.

Наиболее высокий уровень экспрессии маркеров CD282 (TLR2) наблюдали на лимфоцитах людей со здоровым пародонтом (**табл. 2**). У пациентов 1-й группы относительное и абсолютное содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD282, было в 3 раза ниже, чем у представителей контрольной группы. У пациентов 2-й группы относительное содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD282, было ниже в 4 раза, чем у представителей контрольной группы, а абсолютное — в 5,7 раза.

Экспрессия CD282 на моноцитах периферической крови у пациентов 2-й группы была в 1,4 раза выше, чем у людей в контрольной группе. Тем не менее у пациентов 2-й группы относительное количество моноцитов, экспрессирующих TLR2, было в 10 раз меньше, чем в контрольной группе, а абсолютное содержание — в 13,9 раза меньше.

На нейтрофилах экспрессия CD282 была ещё ниже. Так, у пациентов 1-й группы относительное и абсолютное содержание было меньше, чем в контрольной группе, в 2,8 и 3,0 раза, а у больных 2-й группы — в 4,3 и 6,8 раза.

Экспрессия CD284 (TLR4) на лейкоцитах периферической крови у обследованных пациентов имела такой

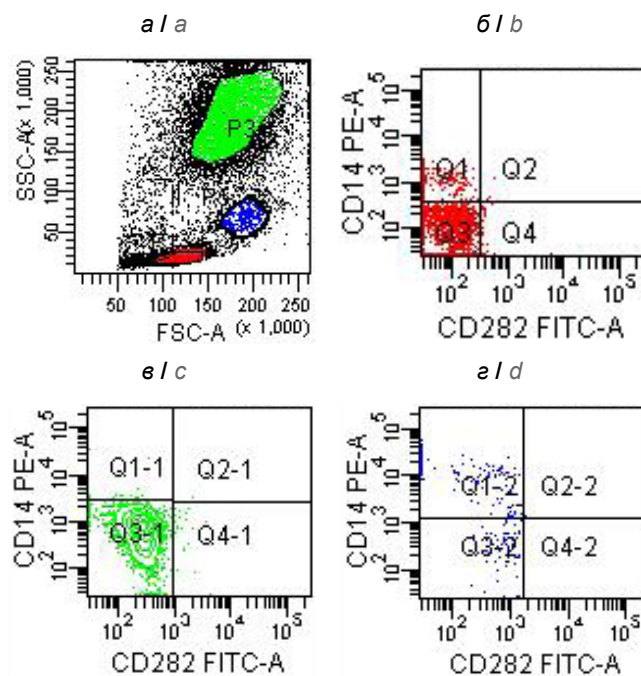


Рис. 4. Экспрессия TLR2 на лейкоцитах периферической крови.

Здесь и на рис. 5: а — график переднего и бокового светорассеяния: нейтрофилы — область, окрашенная в зелёный цвет, лимфоциты — участки красного цвета, моноциты — синего цвета; б-г — двумерный точечный график — экспрессия CD14, CD282

и CD14/CD282 на клетках разных популяций лейкоцитов.

Fig. 4. TLR2 expression on peripheral blood leukocytes.

Here and in Fig. 5: a — graph of front and side light scattering: neutrophils — green area, lymphocytes — red area, monocytes — blue area; b-d — two-dimensional dot-plot — expression of CD14, CD282, and CD14/CD282 on cells of different leukocyte populations.

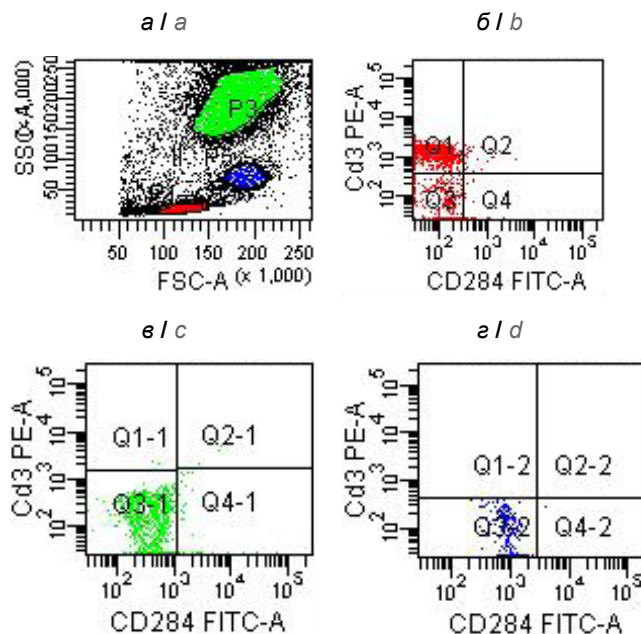


Рис. 5. Экспрессия TLR4 на лейкоцитах периферической крови.

Fig. 5. TLR4 expression on peripheral blood leukocytes.

Таблица 2. Экспрессия CD282 (TLR2) на лейкоцитах периферической крови**Table 2.** Expression of CD282 (TLR2) on peripheral blood leukocytes

Группа Group		Экспрессия CD282 (TLR2) Expression of CD282 (TLR2)		
		лимфоциты lymphocytes	моноциты monocytes	нейтрофилы neutrophils
Пациенты со здоровым пародонтом Patients with healthy periodontium	%	1,06 ± 0,45	0,65 ± 0,11	0,34 ± 0,04
	абс., 10 ⁶ /л abs. 10 ⁶ /liter	56,24 ± 24,12	34,45 ± 5,71	18,15 ± 2,16
1-я 1 st	%	0,35 ± 0,01*	0,91 ± 0,43*	0,12 ± 0,01*
	абс., 10 ⁶ /л abs. 10 ⁶ /liter	18,82 ± 0,93*	43,72 ± 5,34*	6,13 ± 0,93*
2-я 2 nd	%	0,26 ± 0,05*	0,065 ± 0,028	0,08 ± 0,01*
	абс., 10 ⁶ /л abs. 10 ⁶ /liter	9,91 ± 1,91*	2,48 ± 1,12*	2,67 ± 3,05*

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с пациентами со здоровым пародонтом.

Note. * $p < 0.05$ compared with the patients with healthy periodontium.

Таблица 3. Экспрессия CD284 (TLR4) на лейкоцитах периферической крови**Table 3.** Expression of CD284 (TLR4) on peripheral blood leukocytes

Группа Group		Экспрессия CD284 (TLR4) Expression of CD284 (TLR4)		
		лимфоциты lymphocytes	моноциты monocytes	нейтрофилы neutrophils
Пациенты со здоровым пародонтом Patients with healthy periodontium	%	0,26 ± 0,12	0,145 ± 0,003	0,35 ± 0,05
	абс., 10 ⁶ /л abs. 10 ⁶ /liter	13,52 ± 6,50	7,63 ± 1,51	18,25 ± 3,11
1-я 1 st	%	0,73 ± 0,13*	2,17 ± 0,18*	0,275 ± 0,083*
	абс., 10 ⁶ /л abs. 10 ⁶ /liter	39,06 ± 2,79*	117,02 ± 3,8*	14,79 ± 1,78
2-я 2 nd	%	0,31 ± 0,11	0,09 ± 0,04*	0,21 ± 0,07*
	абс., 10 ⁶ /л abs. 10 ⁶ /liter	11,81 ± 4,19*	3,39 ± 2,67*	8,05 ± 2,67*

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с пациентами со здоровым пародонтом.

Note. * $p < 0.05$ compared with the patients with healthy periodontium.

же характер, хотя на лимфоцитах пациентов 1-й группы этих рецепторов было в 2,8 и 2,9 раза больше, чем в контрольной группе. У пациентов 2-й группы относительное содержание CD284⁺-лимфоцитов было выше, чем у людей со здоровым пародонтом, только в 1,2 раза, а абсолютное количество — в 1,14 раза ниже (табл. 3).

На моноцитах самая высокая экспрессия CD284 была также у пациентов 1-й группы с ХП средней степени тяжести — в 15 раз больше, чем у пациентов контрольной группы. Самая низкая экспрессия — у пациентов 2-й группы с ХП тяжёлой степени и признаками резорбции челюстных костей — относительное количество в 1,7 раза меньше, а абсолютное — в 2,3 раза меньше, чем у представителей контрольной группы.

На нейтрофилах самая высокая экспрессия CD284 была в крови у людей контрольной группы; у пациентов 1-й группы относительное количество было ниже, чем в контрольной группе, в 1,3 раза, абсолютное — в 1,2 раза, а у пациентов 2-й группы относительное количество было ниже в 1,7 раза и абсолютное — в 2,3 раза (табл. 3). Следует отметить, что у пациентов 1-й группы относительное количество нейтрофилов, экспрессирующих TLR2, было в 1,5 раза выше, чем у пациентов 2-й группы, моноцитов — в 15 раз и лимфоцитов — в 1,3 раза. Разница в абсолютном содержании была ещё больше:

в 2,3, 17,6 и 1,9 раза соответственно. Относительное количество нейтрофилов, экспрессирующих TLR4, у пациентов 1-й группы было выше, чем у пациентов 2-й группы, в 1,3 раза, моноцитов — в 25,5 раза, лимфоцитов — в 2,3 раза. Разница в абсолютном содержании также была выше: в 1,84, 34,5 и 3,3 раза соответственно.

Обсуждение

В результате проведенных исследований установлено, что у пациентов с ХП, ассоциированным с доминированием анаэробных возбудителей *P. gingivalis* и *F. alocis*, основные популяции лейкоцитов периферической крови (нейтрофилы, моноциты и лимфоциты) отличаются по выраженности экспрессии TLR2 и TLR4. У людей со здоровым пародонтом самая высокая экспрессия TLR2 наблюдается на лимфоцитах, в меньшей степени — на моноцитах и самая низкая — на нейтрофилах периферической крови. У них больше всего было выявлено нейтрофилов с TLR4, в меньшем количестве — лимфоцитов и ещё в меньшем — моноцитов.

Напротив, у пациентов с ХП экспрессия TLR2 была выше на моноцитах, но ниже — на нейтрофилах и лимфоцитах по сравнению с контролем; экспрессия TLR4 выше на моноцитах и лимфоцитах, но ниже на нейтрофилах.

Полученные результаты свидетельствуют о возможной зависимости данного феномена от прогрессирования заболевания пародонта, на что указывает большая выраженность костно-резорбтивных процессов у пациентов с ХП тяжёлой степени. Экспрессия TLR2 на всех изучаемых популяциях лейкоцитов у пациентов с ХП, ассоциированным с выраженной резорбцией альвеолярной кости, была ниже, чем у здоровых людей, в 4–14 раз и в 1,3–15 раза, чем у больных пародонтитом, без выраженного прогрессирования. Экспрессия TLR4 у этих пациентов также была ниже в 1,2–2,3 раза, чем у здоровых людей, и в 1,3–25,5 раза ниже по сравнению с экспрессией TLR на лейкоцитах больных ХП средней степени тяжести без прогрессирования.

Выводы

1. Уровень экспрессии TLR2 и TLR4 принципиально не отличается на нестимулированных клетках периферической крови (нейтрофилах, моноцитах и лимфоцитах) и десневой жидкости у людей со здоровым пародонтом, но варьирует при развитии ХП.

2. У больных с ХП средней и тяжёлой степени в фазе обострения, ассоциированным с представителями пародонтопатогенной микробиоты, преимущественно *P. gingivalis* и *F. alocis*, выявлена разнонаправленная экспрессия рецепторов TLR2 и TLR4 на клетках периферической крови — в сторону как увеличения, так и уменьшения.

3. Достоверно более низкие показатели экспрессии маркеров TLR2 и TLR4 на клетках периферической крови наблюдали при ХП тяжёлой степени, который сопровождался признаками костной резорбции челюстных костей, что позволяет сделать предположение о том, что изменения в системе врождённого иммунитета, проявляющиеся на уровне экспрессии TLR, связаны с системной потерей минеральной плотности костной ткани и прогрессированием ХП.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Carrion J., Scisci E., Miles B., Sabino G.J., Zeituni A.E., Gu Y., et al. Microbial carriage state of peripheral blood dendritic cells (DCs) in chronic periodontitis influences DC differentiation, atherogenic potential. *J. Immunol.* 2012; 189(6): 3178–87. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201053>
2. Darveau R.P., Pham T.T., Lemley K., Reife R.A., Bainbridge B.W., Coats S.R., et al. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. *Infect. Immun.* 2004; 72(9): 5041–51. <https://doi.org/10.1128/iai.72.9.5041-5051.2004>
3. Mathews J.B., Wright H.J., Roberts A., Cooper P.R., Chaple I.L. Hyperactivity and reactivity of peripheral blood neutrophils in chronic periodontitis. *Clin. Exp. Immunol.* 2007; 147(2): 255–64. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03276.x>
4. Moutsopoulos N.M., Konkel J.E. Tissue specific immunity at the oral mucosal barrier. *Trends Immunol.* 2018; 39(4): 276–87. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.08.005>
5. Murakami T. Understanding and treatment strategy of the pathogenesis of periodontal disease based on chronic inflammation. *Clin. Calcium.* 2016; 26(5): 766–72. (in Japanese)

6. Papadopoulos G., Shaik-Dasthagirisahab Y.B., Huang N., Viglianti G.A., Henderson A.J., Kantarci A., et al. Immunologic environment influences macrophage response to *Porphyromonas gingivalis*. *Mol. Oral. Microbiol.* 2017; 32(3): 250–61. <https://doi.org/10.1111/omi.12168>
7. Wilensky A., Chaushu S., Shapira L. The role of natural killer cells in periodontitis. *Periodontol.* 2000. 2015; 69(1): 128–41. <https://doi.org/10.1111/prd.12092>
8. Burns E., Bachrach G., Shapira L., Nussbaum G. Cutting Edge: TLR2 is required for the innate response to *Porphyromonas gingivalis*: activation leads to bacterial persistence and TLR2 deficiency attenuates induced alveolar bone resorption. *J. Immunol.* 2006; 177(12): 8296–300. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.12.8296>
9. Jia L., Han N., Du J., Guo L., Luo Z., Liu Y. Pathogenesis of important virulence factors of *Porphyromonas gingivalis* via toll-like receptors. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019; (9): 262. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00262>
10. Krauss J.L., Potempa J., Lambris J.D., Hajishengallis G. Complementary Tolls in the periodontium: how periodontal bacteria modify complement and Toll-like receptor responses to prevail in the host. *Periodontol.* 2000. 2010; 52(1): 141–62. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2009.00324.x>
11. Mukherjee S., Huda S., Sinha Babu S.P. Toll-like receptor polymorphism in host immune response to infectious diseases: a review. *Scand. J. Immunol.* 2019; 90(1): e12771. <https://doi.org/10.1111/sji.12771>
12. Nichols F.C., Yao X., Bajrami B., Downes J., Finegold S.M., Knee E., et al. Phosphorylated dihydroceramides from common human bacteria are recovered in human tissues. *PLoS One.* 2011; 6(2): e16771. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016771>
13. Trejo-de la O.A., Hernández-Sancén P., Maldonado-Bernal C. Relevance of single-nucleotide polymorphisms in human TLR genes to infectious and inflammatory diseases and cancer. *Genes Immun.* 2014; 15(4): 199–209. <https://doi.org/10.1038/gene.2014.10>
14. Байракова А.Л., Воропаева Е.А., Афанасьев С.С., Алешкин В.А., Несвижский Ю.В., Караулов А.В. и др. Роль и биологическое значение Толл-подобных рецепторов в антиинфекционной резистентности организма. *Вестник Российской академии медицинских наук.* 2008; (1): 45–54.
15. Бондаренко В.М., Гинцбург А.Л., Лиходед В.Г. Роль инфекционного фактора в патогенезе атеросклероза. *Эпидемиология и инфекционные болезни.* 2011; (1): 7–11.
16. Koren O., Spor A., Felin J., Fåk F., Stombaugh J., Tremaroli V., et al. Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2011; 108(Suppl. 1): 4592–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011383107>
17. Хайтов Р.М., Пинегин Б.В., Ярилин А.А. *Руководство по клинической иммунологии: диагностика заболеваний иммунной системы.* М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009.

REFERENCES

1. Carrion J., Scisci E., Miles B., Sabino G.J., Zeituni A.E., Gu Y., et al. Microbial carriage state of peripheral blood dendritic cells (DCs) in chronic periodontitis influences DC differentiation, atherogenic potential. *J. Immunol.* 2012; 189(6): 3178–87. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201053>
2. Darveau R.P., Pham T.T., Lemley K., Reife R.A., Bainbridge B.W., Coats S.R., et al. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. *Infect. Immun.* 2004; 72(9): 5041–51. <https://doi.org/10.1128/iai.72.9.5041-5051.2004>
3. Mathews J.B., Wright H.J., Roberts A., Cooper P.R., Chaple I.L. Hyperactivity and reactivity of peripheral blood neutrophils in chronic periodontitis. *Clin. Exp. Immunol.* 2007; 147(2): 255–64. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03276.x>

4. Moutsopoulos N.M., Konkel J.E. Tissue specific immunity at the oral mucosal barrier. *Trends Immunol.* 2018; 39(4): 276–87. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.08.005>
5. Murakami T. Understanding and treatment strategy of the pathogenesis of periodontal disease based on chronic inflammation. *Clin. Calcium.* 2016; 26(5): 766–72. (in Japanese)
6. Papadopoulou G., Shaik-Dasthagirisheh Y.B., Huang N., Viglianti G.A., Henderson A.J., Kantarci A., et al. Immunologic environment influences macrophage response to *Porphyromonas gingivalis*. *Mol. Oral. Microbiol.* 2017; 32(3): 250–61. <https://doi.org/10.1111/omi.12168>
7. Wilensky A., Chaushu S., Shapira L. The role of natural killer cells in periodontitis. *Periodontol. 2000.* 2015; 69(1): 128–41. <https://doi.org/10.1111/prd.12092>
8. Burns E., Bachrach G., Shapira L., Nussbaum G. Cutting Edge: TLR2 is required for the innate response to *Porphyromonas gingivalis*: Activation leads to bacterial persistence and TLR2 deficiency attenuates induced alveolar bone resorption. *J. Immunol.* 2006; 177(12): 8296–300. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.12.8296>
9. Jia L., Han N., Du J., Guo L., Luo Z., Liu Y. Pathogenesis of important virulence factors of *Porphyromonas gingivalis* via toll-like receptors. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019; (9): 262. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00262>
10. Krauss J.L., Potempa J., Lambris J.D., Hajishengallis G. Complementary Tolls in the periodontium: How periodontal bacteria modify complement and Toll-like receptor responses to prevail in the host. *Periodontol. 2000.* 2010; 52(1): 141–62. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2009.00324.x>
11. Mukherjee S., Huda S., Sinha Babu S.P. Toll-like receptor polymorphism in host immune response to infectious diseases: A review. *Scand. J. Immunol.* 2019; 90(1): e12771. <https://doi.org/10.1111/sji.12771>
12. Nichols F.C., Yao X., Bajrami B., Downes J., Finegold S.M., Knee E., et al. Phosphorylated dihydroceramides from common human bacteria are recovered in human tissues. *PLoS One.* 2011; 6(2): e16771. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016771>
13. Trejo-de la O.A., Hernández-Sancén P., Maldonado-Bernal C. Relevance of single-nucleotide polymorphisms in human TLR genes to infectious and inflammatory diseases and cancer. *Genes Immun.* 2014; 15(4): 199–209. <https://doi.org/10.1038/gene.2014.10>
14. Bayrakova A.L., Voropaeva E.A., Afanas'ev S.S., Aleshkin V.A., Nesvizhskiy Yu.V., Karaulov A.V. et al. The role and biological significance of Toll-like receptors in the anti-infectious resistance of the organism. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk.* 2008; (1): 45–54. (in Russian)
15. Bondarenko V.M., Gintsburg A.L., Likhoded V.G. Implication of an infectious factor in the pathogenesis of atherosclerosis. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni.* 2011; (1): 7–11. (in Russian)
16. Koren O., Spor A., Felin J., Fåk F., Stombaugh J., Tremaroli V., et al. Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2011; 108(Suppl. 1): 4592–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011383107>
17. Khaitov R.M., Pinegin B.V., Yarin A.A. *Manual of Clinical Immunology: Diagnosis of Diseases of the Immune System [Rukovodstvo po klinicheskoy immunologii: diagnostika zabolevaniy immunnoy sistemy]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2009. (in Russian)

Информация об авторах

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

Николаева Елена Николаевна — д.м.н., профессор, г.н.с. лаб. молекулярно-биологических исследований Научно-исследовательского медицинского стоматологического института МГМСУ им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7854-3262>

Ипполитов Евгений Валерьевич — д.м.н., профессор, с.н.с. лаб. молекулярно-биологических исследований Научно-исследовательского медицинского стоматологического института МГМСУ им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1737-0887>

Царева Татьяна Викторовна — к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9571-0520>

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

Балмасова Ирина Петровна — д.м.н., профессор, зав. лаб. патогенеза и методов лечения инфекционных заболеваний Научно-исследовательского медицинского стоматологического института МГМСУ им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8194-2419>

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

Статья поступила в редакцию 09.09.2022;
принята к публикации 26.10.2022;
опубликована 30.10.2022

Information about the authors

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

Elena N. Nikolaeva — D. Sci. (Med.), Professor, main senior researcher, Laboratory of molecular biological researches, Scientific Research Medical Dental Institute, Moscow State University of Medicine and Dentistry named A.I. Evdokimov, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7854-3262>

Evgeniy V. Ippolitov — D. Sci. (Med.), Professor, senior researcher, Laboratory of molecular biological researches, Scientific Research Medical Dental Institute, Moscow State University of Medicine and Dentistry named A.I. Evdokimov, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1737-0887>

Tatyana V. Tsareva — Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of microbiology, virology, immunology, Moscow State University of Medicine and Dentistry named A.I. Evdokimov, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9571-0520>

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

Irina P. Balmasova — D. Sci. (Med.), Professor, Head, Laboratory of pathogenesis and methods of treatment of infectious diseases, Scientific Research Medical Dental Institute, Moscow State University of Medicine and Dentistry named A.I. Evdokimov, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8194-2419>

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

The article was submitted 09.09.2022;
accepted for publication 26.10.2022;
published 30.10.2022

ОБЗОРЫ

Обзорная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-331>



К вопросу об актуальности разработки и перспективам использования препарата бактериофага *Streptococcus pneumoniae*

Захарова Ю.А.[✉], Иващенко И.А., Болгарова Е.В.

Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора, Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Распространённость штаммов *Streptococcus pneumoniae*, вызывающих инвазивные формы пневмококковой инфекции, и растущие показатели антибиотикорезистентности отдельных серотипов возбудителя ставят в ряд актуальных и социально значимых задач поиск новых антимикробных средств для профилактики и лечения.

Цель — провести поиск научных публикаций отечественных и зарубежных авторов о проблемах практического использования и перспективах разработки препарата бактериофага *S. pneumoniae* узконаправленного действия на актуальные серотипы возбудителя.

Результаты. Анализ литературных источников в научных электронных базах и издательствах eLibrary.Ru, ScienceDirect, Scopus, PubMed, Springerlink, Wiley Online Library, Annual reviews позволил обобщить сведения о 4 выделенных литических бактериофагах *S. pneumoniae* и их эндолизинах, а также 2 умеренных фагах, представить данные клинической эффективности стрептококкового бактериофага при пневмококковой инфекции у животных и человека. Результаты поисковых запросов о наиболее значимых и распространённых на территории России серотипах *S. pneumoniae* установили преобладание в структуре вариантов 19F, 14, 9V/A, 15 A/F, 6 A/B/C/D, 3 и 23F. Часть из них характеризуется высоким уровнем антибиотикорезистентности и вызывает тяжёлые формы заболевания, при этом серотипы 15 A/F/C и 6 C/D не представлены в составе современных вакцинных штаммов, что повышает актуальность разработки и использования пневмококкового бактериофага, в том числе для внутривидового типирования значимых и распространённых серотипов.

Заключение. На основании анализа современного состояния вопроса о пневмококковых бактериофагах, полученных сведений о циркуляции актуальных штаммов *S. pneumoniae* на территории России и их серотиповом пейзаже сделан вывод об актуальности разработки препарата бактериофага *S. pneumoniae* как средства направленного действия для профилактики, диагностики и персонализированной терапии заболеваний человека пневмококковой этиологии.

Ключевые слова: *Streptococcus pneumoniae*, бактериофаги, фаготерапия, фагопрофилактика, фагодиагностика, литературный обзор

Источник финансирования. Исследование поддержано грантом Российского научного фонда № 22-25-20129.

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

Для цитирования: Захарова Ю.А., Иващенко И.А., Болгарова Е.В. К вопросу об актуальности разработки и перспективам использования препарата бактериофага *Streptococcus pneumoniae*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(5):573–586.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-331>

Review article
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-331>

To the question of the relevance of the development and prospects for the use of the bacteriophage *Streptococcus pneumoniae*

Yuliya A. Zakharova , Ivan A. Ivashchenko, Ekaterina V. Bolgarova

Yekaterinburg Research Institute of Viral Infections, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Yekaterinburg, Russia

Abstract

Introduction. The prevalence of *Streptococcus pneumoniae* strains causing invasive forms of pneumococcal infection and the growing rates of antibiotic resistance of individual serotypes of the pathogen pose a number of urgent and socially significant tasks the search for new antimicrobial agents for prevention and treatment.

Objective. To analyze the data of scientific publications of domestic and foreign authors on the problems of practical use and prospects for the development of the bacteriophage *S. pneumoniae* drug aimed at the actual serotypes of the pathogen.

Results. Analysis of literary sources in scientific electronic databases and publishing houses eLibrary.Ru, ScienceDirect, Scopus, PubMed, Springerlink, Wiley Online Library, Annual reviews allowed us to summarize information about four isolated lytic bacteriophages of *S. pneumoniae* and their endolysins, as well as about two lysogenic phages, to present data on the clinical efficacy of streptococcal bacteriophage in pneumococcal infection in animals and humans. The results of search queries on the most significant and widespread serotypes of *S. pneumoniae* in the territory of the Russian Federation have established the predominance in the structure of variants 19F, 14, 9V/A, 15 A/F, 6 A/B/C/D, 3 and 23F. Some of them are characterized by a high level of antibiotic resistance and cause invasive forms of the disease, and serotypes 15 A/F/C, 6 C/D are not represented in modern vaccines, which increases the relevance of the development and use of pneumococcal bacteriophage, including intraspecific typing of significant and common serotypes.

Conclusion. Based on the analysis of the current state of the issue of pneumococcal bacteriophages, the information obtained on the circulation of topical strains of *S. pneumoniae* on the territory of the Russian Federation and their serotype landscape, it is concluded that the development of the bacteriophage *S. pneumoniae* drug is relevant as a means of targeted action for the prevention, diagnosis and personalized therapy of human diseases of pneumococcal etiology.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, bacteriophages, phage therapy, phage prophylaxis, phage diagnostics, literature review

Funding source. The study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 22-25-20129.

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

For citation: Zakharova Yu.A., Ivashchenko I.A., Bolgarova E.V. To the question of the relevance of the development and prospects for the use of the bacteriophage *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(5):573–586.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-331>

Введение

Актуальной проблемой для многих стран мира являются инфекции пневмококковой этиологии. Патоген *Streptococcus pneumoniae* при определённых условиях может вызывать у человека ряд инфекционных заболеваний и угрожающих состояний, в том числе пневмонию, отит, синусит, менингит, сепсис, эндокардит, артрит и др.¹ К группам риска по заболеваемости относят детей, лиц пожилого возраста, пациентов с

хронической патологией сердечно-сосудистой системы, органов дыхания и печени, функциональной или анатомической аспленией, сахарным диабетом, иммунодефицитами, травмами черепа, позвоночника и др. [1, 2]. Снижение заболеваемости и смертности от пневмококковой пневмонии остаётся одной из приоритетных задач клинической и профилактической медицины [3]. Широкое географическое распространение *S. pneumoniae*, способность формировать устойчивые к антибиотикам штаммы [4–9] диктуют необходимость разработки новых антимикробных средств. Согласно Плану реализации мероприятий в рамках Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в России на период

¹ Справочник MSD. Профессиональная версия. Пневмококковая инфекция. URL: <https://www.msdmanuals.com/ru/профессиональный/инфекционные-болезни/грамположительные-кокки/пневмококковые-инфекции>

до 2030 г.² к приоритетным биотехнологическим разработкам в этой области относят препараты бактериофагов. Благодаря специфичности, высокой противомикробной активности, способности к накоплению в очаге поражения, проникновению через биологические барьеры бактериофаги являются перспективными кандидатами, нацеленными на актуальные штаммы *S. pneumoniae*.

Основная часть

Исследования по получению пневмококкового бактериофага берут начало на Урале в Пермском Институте эпидемиологии и микробиологии Наркомздрава РСФСР (в настоящее время филиал НПО «Биомед» ФГУП НПО «Микроген», Пермь). В 1935 г. аспирантке института А.М. Родигиной на чувствительных бактериальных культурах *S. pneumoniae* впервые удалось выделить стрептококковый бактериофаг [10]. Под руководством профессора П.И. Чистякова проведены 3 серии экспериментов на 16 лабораторных животных (кролики) с целью изучения возможности использования бактериофага в офтальмологии при язвенном поражении роговой оболочки глаза. Каждому кролику в роговицу выполнена инъекция раствором, содержащим клинические вирулентные штаммы пневмококка, что приводило к развитию язвенного процесса. В «опытной» группе животных применяли подкожно-инъективные инъекции и/или обильное промывание роговицы полученным фаголизатом, при этом во всех случаях язвенный процесс прекращался и наступала реконвалесценция. В контрольной группе животных заболевание продолжалось более длительный период времени и осложнялось иритом, гипопионом и паноптальмитом. Таким образом, впервые на биологической модели была доказана клиническая эффективность нового антимикробного средства. Однако бактериофаг не имел узкой специфичности.

В настоящее время Россия является мировым лидером по производству препаратов бактериофагов, включая стрептококковые. На базе НПО «Микроген» выпускают широкую линейку моно- и поливалентных фагов. Так, «Бактериофаг стрептококковый» представляет собой фильтрат фаголизатов различных видов *Streptococcus*. Действующим активным веществом коммерческого препарата «Секстафаг» (МНН препарата Пиобактериофаг) являются фаголизаты *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Proteus* (*P. vulgaris*, *P. mirabilis*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumo-*

niae. Препарат «Пиобактериофаг комплексный» (МНН препарата Пиобактериофаг) включает фаги *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*. Сочетание бактериофагов в препарате повышает эффективность эмпирической терапии, однако может оказать существенное влияние на резидентную микрофлору.

Верхние дыхательные пути человека как один из важнейших его биотопов имеют значительное представительство микробных ассоциаций. Согласно исследованию И.А. Беляева и соавт., проведённому во всех возрастных группах населения, выявлено, что стрептококки в зеве являются доминирующими видами [11]. Эти данные подтверждает работа Е.В. Беляевой и соавт., где установлена ведущая роль *Streptococcus* (75,2%) в микробиоценозе носоглотки [12]. При этом нарушение состава ассоциантов приводило к развитию активного инфекционного процесса [11–13]. I. Fujimori и соавт. установили высокий риск инфицирования пациентов вирулентными штаммами β-гемолитического стрептококка группы А (*S. pyogenes*) при пониженном уровне содержания в зеве α-гемолитических стрептококков [14, 15]. Авторы объяснили это способностью большинства α-гемолитических стрептококков выделять бактериоцины, подавляющие рост *S. pyogenes* [18].

S.E. Tzannetis и соавт. отметили влияние некоторых штаммов оральных стрептококков на стафилококки [17]. Используя технику отсроченного антагонизма, они установили, что наибольшую ингибирующую активность против штаммов стафилококков имели стрептококки определённых видов, в том числе *S. mutans*, *S. sanguis* и *S. mitior*, наименьшей активностью обладали *S. milleri* и *S. salivarius*. В целом назальные штаммы стрептококков оказались более чувствительны к «природным» ингибиторам, чем оральные. Сделан вывод о важной защитной функции оральных стрептококков. Подтверждением явилась работа Н. Bisgaard и соавт., где основным микробным фактором в развитии бронхиальной астмы у детей к 5 годам жизни определены *S. pneumoniae*, *H. influenzae* и *M. catarrhalis* при условии колонизации этими видами ротовой полости новорождённых на фоне отсутствия представителей нормофлоры [18]. Дисбиотические состояния полости рта у взрослых лиц на фоне приёма антибиотиков влекли за собой развитие пародонтита и кариеса [19, 20]. Использование антимикробных средств широкого спектра действия приводило к серьёзным нарушениям баланса внутри микробного сообщества и к потере ключевых симбиотических видов бактерий, которые в нормальных условиях предотвращают чрезмерный рост патогенов, что необходимо учитывать при персонализированной

² Распоряжение Правительства РФ от 30.03.2019 № 604-р «Об утверждении Плана мероприятий на 2019–2024 годы по реализации Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года. М.; 2019.

терапии.

Примеры фаготерапии у человека при пневмококковой инфекции немногочисленны, посвящены использованию комплексных препаратов со стрептококковым компонентом. В.Г. Акимкин и соавт. выявили положительный эффект препарата «Бактериофаг стрептококковый» (АО НПО «Микроген») у лиц со стрептококковой инфекцией из организованных коллективов [21]. После профилактического курса аэрозольным орошением ротоглотки бактериофагом (по 1,5–2,0 мл препарата 2 раза в день) количество выделенных стрептококков в группе наблюдения уменьшилось в 2,4 раза, преимущественно за счёт доли *S. pneumoniae*. В группе сравнения количество бактериальных культур, напротив, увеличилось в 2,8 раза. Заболеваемость среди лиц, получивших бактериофаг, снизилась в 1,8 раза, в группе «сравнения» выросла в 1,4 раза.

В настоящее время определена полная геномная последовательность пневмококковых бактериофагов Dp-1 и MM-1 (семейство *Siphoviridae*), Cp-1 и SOCP (семейство *Podoviridae*) и фага EJ-1 (семейство *Myoviridae*). В 2017 г. получен фаг MS1 с синтетическим геномом по отношению к фагу Dp-1 и средней идентичностью нуклеотидов 73,3% (на 62,3% выровненных последовательностей) [22]. Фаги Cp-1, SOCP, Dp-1 и MS1 отнесены к группе литических, фаги MM-1, EJ-1 — к группе умеренных, которые способны интегрировать свой геном в геном бактериальной клетки. Встроенный ген может передаваться дочерним клеткам при их делении. При этом бактерии, несущие в составе своего генома геном бактериофага, определены как лизогенные, а интегрированный фаг назван профагом. Эта микробная ассоциация «хозяин–паразит» будет существовать до тех пор, пока стрессовые условия не приведут к индукции профага из генома бактерии с возможной реализацией бактериофагом литического цикла развития. Известно, что профаги (или их остатки) широко распространены в геноме *S. pneumoniae*. По последним оценкам, их несут до 90% бактериальных изолятов [23].

Первым из пневмококковых бактериофагов охарактеризован фаг Dp-1 семейства *Siphoviridae*, полученный М. McDonnell и соавт. от пациентов с лёгкими симптомами инфекции верхних дыхательных путей [24]. Фаг в форме икосаэдрического капсида ($69,8 \pm 1,2$ нм) с длинным несокращающимся хвостовым отростком (длина — $169,9 \pm 3,6$ нм, ширина — $19,6 \pm 2$ нм), литическим циклом развития [25] описан как первый фаг грамположительной бактерии, содержащий липиды (8,5% от сухой массы) [26]. Авторы указали на высокий уровень чувствительности Dp-1 к органическим растворителям и, как следствие, на его низкую стабильность (хлороформ активно используют при консервации и длительном хранении фаголизата). Первым этапом

инфекционного процесса с участием бактериофага является адсорбция фаговых частиц на поверхности бактериальной клетки путём взаимодействия фага со специфическими рецепторами. Для адсорбции фага Dp-1 необходимы остатки фосфорилхолина, который входит в состав тейхоевых кислот всех грамположительных бактерий [27]. К фосфорилхолину нековалентно прикреплены холинсвязывающие белки Cbp, одним из них является белок CpbA, основной пневмококковый адгезин [28, 29]. К фосфорилхолину также крепятся холинсвязывающие литические ферменты, в их числе LytA (N-ацетилмурамоил-1-аланинамидаза). Как основной аутолизин он приводит к лизису бактериальных колоний, способствует пленкообразованию [30]. Вывод о необходимости холиновых (choline) остатков для адгезии фага Dp-1 сделан R. Lopez и соавт. на основе культивирования *S. pneumoniae*, где вместо холина (choline) в состав питательной среды были включены другие аминоспирты (этанолламин, N-монометиламиноэтанолламин, N-диметиламиноэтанолламин) [27]. Пневмококки на средах с добавлением этаноламина и N-монометиламиноэтанолламина значительно хуже адсорбировали фаг. При этом повышенная концентрация Dp-1 и время инкубации не оказывали существенного влияния на эффективность показателя скорости адсорбции. Авторами отмечено, что штаммы *S. pneumoniae*, культивируемые на питательных средах с этаноламином, в присутствии холина (choline) восстанавливали способность адсорбировать фаг.

Анализ генома фага Dp-1 проведён М. Sabri и соавт. [31]. Фаг имел длину 56 506 пар нуклеотидов, включал 156 взаимодействий и 72 рамки считывания. Содержание G+C в нём составило 40,3%, что близко (39%) к содержанию G+C в геноме *S. pneumoniae*. Последовательность генома Dp-1 загружена в базу данных GenBank под регистрационным номером HQ268735³. Авторы выявили гомологию большинства генов Dp-1 с генами других фагов грамположительных бактерий — как вирулентных, так и умеренных. В частности, установлена отдалённая гомология гена упаковочного кластера (*orf23*) фага Dp-1 и фрагмента гена большой субъединицы терминазы (*orf37*) умеренного фага EJ-1. Каркасный белок Gp41 (авторы назвали белок фага Dp-1 glycoprotein 41), кодируемый *orf41*, оказался гомологичным капсидному белку Gp23 фага *S. aureus* 88 и консервативному домену каркасного белка Gp20 фага *Lactobacillus mv4*. Обнаруженный феномен иллюстрирует последствия генетического обмена между популяциями фагов, который происходит через сообщества «бак-

³ Национальная библиотека медицины. Стрептококковый фаг Dp-1, полный геном.
URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HQ268735>

терий-хозяев».

Следующим литическим фагом *S. pneumoniae*, выделенным из зева здоровых детей С. Ronda и соавт., был фаг Ср-1 семейства *Podoviridae* [32]. Морфологически фаг представлен вытянутым гексагональным капсидом ($65,8 \pm 1,1$ на $42,1 \pm 1,7$ нм) с коротким несокращающимся хвостом (длина $19,3 \pm 1$ нм, ширина $7,5 \pm 1,2$ нм) [25]. Авторы отметили стабильность фага при хранении. Способность Ср-1 инфицировать не только *S. pneumoniae*, но и *S. oralis* отмечена в работе С. Ronda и соавт. [33]. Ср-1 имеет геном линейной двухцепочечной ДНК с концевым белком, ковалентно связанным с его 5'-концами. ДНК фага реплицируется по механизму праймирования белка. Геном имеет 19 343 пары нуклеотидов. Общее содержание G+C в ДНК Ср-1 составляет 38,8%, что коррелирует (39%) с общим содержанием G+C в геноме *S. pneumoniae*. Определены 28 рамок считывания. Для адгезии на поверхности клеточной стенки фагу Ср-1, как и фагу Др-1, необходимы холиновые (choline) остатки [34]. Последовательность генома фага Ср-1 с номером Z47794 выложена в GenBank⁴. Примечательно, что С. Оуеппане и соавт. при секвенировании фага Ср-1 из коллекции Félix d'Hérelle получили последовательность нуклеотидов, отличную от фага Ср-1 Z47794 [27]. В результате Ср-1 Félix d'Hérelle был переименован в SOCP и зарегистрирован в GenBank как фаг KJ617393.1⁵, его геном включает 19 347 п.н. (Ср-1 Z47794 имеет 19 343 п.н.). Установлена возможность лизиса фагами Др-1 и SOCP *S. mitis* [27].

Первым секвенированным умеренным фагом *S. pneumoniae* был фаг MM1. V. Obregón и соавт. определили, что его геном длиной 40 248 п.н. организован 53 открытыми рамками считывания и, по меньшей мере, имеет 5 функциональных кластеров (лизогенный, репликационный, структурный, упакочный, литический). ДНК зрелых фаговых частиц является терминально избыточной и содержит ковалентно связанный белок с 5'-концами. Среднее содержание G+C в ДНК фага MM1 составило 38,4%, что сопоставимо с данными соотношения нуклеотидов в геноме его хозяина — *S. pneumoniae* (39%). Сравнение генома MM1 с геномами других бактериофагов также выявило их сходство с фагами грамположительных бактерий [35].

Электронная микроскопия MM1 установила его принадлежность к семейству *Siphoviridae*. Морфологически фаг имеет форму икосаэдрического капсида (60 нм в диаметре) с длинным несокращающимся хвостом (160 нм в длину) [36]. При этом ре-

акция сайт-специфической рекомбинации, приводящая к интеграции фага в бактериальный геном, опосредуется фаговой интегразой. Процесс происходит путём опознавания и рекомбинации специфических последовательностей ДНК, расположенных в геномах бактерии и фага. Эти «сайты прикрепления» носят названия attB и attP (the bacterial attachment site и the phage attachment site). После встраивания фага в бактериальную клетку образуются два гибридных сайта — attL и attR. Обратная индукция профага предполагает рекомбинацию между attL и attR с образованием attB и attP. E. Gindreau и соавт. идентифицировали и депонировали последовательности attB, attP, attL и attR в GenBank под регистрационными номерами AJ400631, AJ400629, AJ400632 и AJ400630 [36]. Установлено, что гены профага часто оказывают «фенотипическое» влияние на «бактерию-хозяина». Так, в 2006 г. J.M. Loeffler и соавт. изучили лизогенные и нелизогенные штаммы *S. pneumoniae* [37]. В работе использован умеренный фаг MM1-1998 (идентичность последовательностей MM1-1998 с MM1 составила более 99,8%). Лизогенные штаммы *S. pneumoniae* обладали лучшей адгезивной способностью к инертным поверхностям (стекло, пластик) и биологическим тканям (клеточные культуры носоглотки животных). В своём исследовании авторы доказали, что присутствие профага в бактериальной клетке вызывает её фенотипическую модификацию с повышением вирулентности и адаптационных механизмов.

Другим наиболее полно охарактеризованным умеренным фагом *S. pneumoniae* стал фаг EJ-1, выделенный из клинического изолята *S. pneumoniae* 101/87 [38]. Источником выделения фага EJ-1 (индуцирован из бактериальной клетки Митомидином С) был штамм *S. pneumoniae*, полученный из крови пациента с внебольничной пневмонией. Штамм характеризовался устойчивостью к желчи, оптохину, не поддавался серотипированию и нес ген *lytA*, специфичный для всех штаммов *S. pneumoniae* [39]. Умеренный фаг EJ-1, капсид которого представлен 57 нм, имел длинный сокращающийся хвост длиной 130 нм, в последующем был отнесён к семейству *Myoviridae*. Его геном не содержал ковалентно связанных белков. В 2004 г. Р. Ромега и соавт. выложили в GenBank полную геномную последовательность EJ-1 (длиной 42 935 пар нуклеотидов), организованную 73 открытыми рамками считывания и как минимум 5 функциональными кластерами [40]. Среднее содержание G+C в ДНК фага EJ-1 составило 39,6%, идентично (39%) содержанию G+C в геноме *S. pneumoniae* [41].

Активное изучение пневмококковых бактериофагов в дальнейшем продолжилось в плоскости оценки биохимических процессов, происходящих в бактериальной клетке под действием бактериофага, где важным и завершающим этапом является раз-

⁴ Национальная библиотека медицины. Стрептококковый фаг Ср-1, полный геном.
URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/Z47794>

⁵ Национальная библиотека медицины. Стрептококковый фаг SOCP, полный геном.
URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KJ617393>

рушение клеточной стенки бактерии и высвобождение зрелых фаговых частиц. Известно, что бактериальный лизис происходит преимущественно за счёт выработки специфических ферментов, кодируемых фагами. Два различных класса литических ферментов были обнаружены в пневмококковых фагах, в их числе амидазы и лизоцим. Все они разлагают муреин путём гидролиза гликозидной связи между N-ацетилглюкозаминном и N-ацетилмурамовой кислотой или между лактильной группой N-ацетилмурамовой кислоты и аминогруппой L-аланина. Фермент Cpl-1, кодируемый фагом Cp-1, является лизоцимом, а ферменты Pal, Mml и Ejl, кодируемые фагами Dp-1, MM1 и EJ-1, — амидазами. Литические ферменты фагов имеют двухдоменную структуру, где С-концевой домен специфически распознаёт и связывает в клеточной стенке бактерии холин (choline), тогда как N-концевой домен отвечает за расщепление связей в пептидогликане [42, 43]. Особенностью лизиса клетки бактериофагом с двухцепочечной ДНК является синтез белка холина (holin), функция которого заключается в создании повреждений в цитоплазматической мембране. Тем самым для муреингидролаз обеспечивается доступ к муреиновому слою клеточной стенки. Как правило, ген, кодирующий холин (holin), и ген, кодирующий эндолизин, располагаются в геноме фага друг за другом. В частности, продуктами генов 21 и 22 в геноме фага Cp-1 являются лизоцим и холин (holin) соответственно. Данный механизм лизиса называется «холин-лизоцим лизисная стратегия» (holin-lysozyme lysis strategy) [44, 45].

Кодируемые фагами ферменты, специфически разрушающие клеточные стенки бактерий, изучают в плоскости проблемы антибиотикорезистентности. Так, в 2003 г. I. Jado и соавт. исследовали фермент лизоцим Cpl-1, кодируемый фагом Cp-1, и фермент амидазу Pal, кодируемую фагом Dp-1 [46]. В качестве продуцента обоих ферментов использовали штамм *E. coli*, несущий pCIP100 или pMSP11. Действие Cpl-1 и Pal тестировано на модели пневмококкового сепсиса у лабораторных животных (мыши). При внутрибрюшинном заражении животных *S. pneumoniae* и однократном (через 10 мин) введении в брюшную полость Cpl-1 или Pal в течение суток авторы наблюдали дозозависимый терапевтический эффект в форме снижения клинических симптомов заболевания. При использовании 40 мкг Cpl-1 или 40 мкг Pal все животные полностью выздоравливали. Отмечен синергический эффект комбинации двух фаговых литических ферментов. На идентичной биологической модели через 1 ч после заражения и совместного внутрибрюшинного введения по 2,5 мкг Cpl-1 и Pal (при этом суммарная доза компонентов 5 мкг была в 8 раз ниже, чем при использовании монокомпонента в дозе 40 мкг) у животных останавливалось развитие инфекционно-

го процесса. Однократная же инъекция 5 мкг любого из двух перечисленных ферментов в отдельности на фоне введения живой культуры *S. pneumoniae* приводила к летальному исходу. Эффект выздоровления в «опытной» группе животных наблюдали и при более поздней (через 2 ч после заражения) инокуляции литических ферментов, в последующем названных энзибиотиками. В отличие от антибиотиков, требующих постоянной фармакологической концентрации активного вещества, достигаемой при строгом интервале дозирования, однократной инъекции энзибиотика было достаточно для подавления роста клинических изолятов *S. pneumoniae*. Авторы считают эти уникальные субстанции многообещающими кандидатами в качестве средств антимикробной терапии [46].

Одной из перспективных стратегий борьбы с инфекционными болезнями человека и животных считается совместное применение антибиотиков и энзибиотиков. На идентичной модели пневмококковой бактериемии у лабораторных мышей определён синергический эффект комбинации антибиотика — даптомицина и энзибиотика — Cpl-1 [47]. Мышам внутрибрюшинным способом вводили *S. pneumoniae* D39, что приводило в течение 72 ч к летальному исходу. При однократной инъекции даптомицина (0,4 мг/кг) выживаемость мышей на 7-й день эксперимента составляла 35%. При введении Cpl-1 (0,4 мг/кг) все животные погибали в течение 72 ч. Совместное внутрибрюшинное введение даптомицина и Cpl-1 (по 0,4 мг/кг каждого вещества) повышало показатель выживаемости до 80%. У выживших животных отсутствовали признаки инфекции, наблюдалась прибавка в массе тела с той же скоростью, что у неинфицированных. При увеличении дозы Cpl-1 в 2,5 раза (с 0,4 до 1,0 мг/кг) и прежней концентрации даптомицина (0,4 мг/кг) выживаемость на 7-й день достигала 95%. Авторы установили, что использование комбинации Cpl-1 и даптомицина, помимо выраженного клинического эффекта, предотвращало появление устойчивых к даптомицину штаммов *S. pneumoniae*. Таким образом, стратегия применения антибиотика и энзибиотика имела у животных высокую эффективность.

М. Harhala и соавт. провели первые экспериментальные исследования безопасности и токсичности двух эндолизинов фагов Dp-1 и Cp-1 на клеточных культурах человека [48]. На первом этапе авторы осуществили профилирование экспрессии генов на микрочипах для двух клеточных линий: FaDu (плоскоклеточный рак глотки, ATCC HTB-43) и SC (макрофаги периферической крови, ATCC CRL-9855). В последующем клеточные линии подвергали воздействию 0,5 мкМ Pal или Cpl-1 в течение 6 ч. Анализ ДНК на микрочипах не показал статистически значимых различий в показателях экспрессии генов изучаемых клеточных культур.

Авторами также на образцах крови 6 здоровых доноров установлено отсутствие потенциального влияния эндолизинов на систему комплемента *ex vivo*. Оценивали активацию системы по классическому, альтернативному и лектиновому путям. В дальнейшем на биологической модели мыши оценивали показатели выработки специфического иммунного ответа на фоне однократного введения каждого из ферментов Pal или Cpl-1. Период оценки составил 50 дней. Индукция IgG характеризовалась медленным увеличением титра антител до 30-го дня, затем показатель выходил на плато. Динамика формирования IgG явилась типичной для иммунного ответа испытываемой биологической модели на вещества белковой природы. У животных не было отмечено негативных соматических и поведенческих реакций, отсутствовала выработка IgE, связанная с развитием гиперчувствительности и аллергических реакций, стабильным оставался уровень провоспалительных цитокинов, существенно не менялся состав микробиома, однако родственные бактерии из группы *S. mitis* проявили чувствительность к Cpl-1 и Pal. Проведённые исследования выявили незначительное влияние энзимотиков на клеточные и системные функции организма мелких животных, что предопределило перспективу изучения их фармакокинетики и фармакодинамики на крупных млекопитающих и приматах.

Одним из важных механизмов уклонения *S. pneumoniae* от иммунного ответа является полисахаридная капсула. Помимо функции основного фактора патогенности микроорганизма, её присутствие ингибирует внедрение фага в бактериальную клетку за счёт ограничения доступности рецептора, что доказали в лабораторных условиях P. Lerghon и соавт. [49]. Авторы сравнили чувствительность к фагу неинкапсулированного (R6) и инкапсулированного (D39) штаммов *S. pneumoniae*. Неинкапсулированный (бескапсульный) штамм R6 с 1950-х гг. применяют в качестве лабораторного стандарта, отсутствие капсулы делает его авирулентным и безопасным для работы. Родительским штаммом R6 является штамм R36A (производный штамма D39), полученный выращиванием D39 в присутствии кроличьей антисыворотки путём 36 последовательных пассажей [50]. Инкапсулированный (капсульный) штамм D39 исходно демонстрировал полную устойчивость к фагам SOCP и Dr-1, в отличие от штамма R6. Инактивация D39 по гену *cps2C* приводила к уменьшению размера капсулы и появлению у штамма D39 чувствительности к фагам SOCP и Dr-1, аналогично штамму R6. Таким образом, авторы предположили, что капсула *S. pneumoniae* может влиять на резистентность клетки-хозяина к литическому фагу. На уровень экспрессии капсулы *S. pneumoniae* оказывает влияние ряд факторов [51, 52]. В 1998 г. охарактеризованы два основных фе-

нотипа *S. pneumoniae*, обозначенные как «прозрачный» и «непрозрачный», при этом последний обладал выраженной вирулентностью с содержанием концентрации полисахарида в капсуле выше, чем у «прозрачного», в 1,2–5,6 раза [53]. «Прозрачный» фенотип имел в клеточной стенке в 2,1–3,8 раза большее количество тейхоевых кислот. Выявленные отличия подтверждены культивированием *S. pneumoniae* в питательной среде с радиоактивным изотопом холина (^3H choline), входящим в состав тейхоевой кислоты, которая признана единственным резервуаром холина в бактериальной клетке пневмококка. В то же время уровень экспрессии капсулы *S. pneumoniae* непостоянен и обеспечивает условия, при которых фаговая инфекция не будет всё время ингибироваться капсулой. В связи с этим инкапсулированные штаммы пневмококка также подвержены фаголизису.

Более 90 серотипов *S. pneumoniae* в настоящее время идентифицированы по биохимической структуре капсульного полисахарида, что свидетельствует о высокой пластичности и рекомбинантной изменчивости генома возбудителя, приводящей к формированию устойчивости к антибиотикам. В связи с этим серотипирование *S. pneumoniae* по капсульному полисахариду актуально для внутривидовой идентификации микроорганизма, определения тяжести инфекционного процесса и выявления антимикробной резистентности [54, 55]. Изучение актуальных серотипов *S. pneumoniae* на определённых территориях и в отдельных группах населения в зависимости от возраста, практики применения антибиотиков, клинических проявлений инфекции, демографических характеристик, охвата населения вакцинацией, состава вакцинных штаммов имеет значение в плане персонализированного подхода к лечению и профилактике пневмококковой инфекции [56, 57]. Результаты исследований, проведённых в разных странах, свидетельствуют о том, что более 80% наиболее тяжёлых инвазивных случаев заболеваний, как правило, обусловлены 20 основными серотипами, в их числе 13 вызывают до 70–75% случаев манифестных форм. Повышенной устойчивостью к основным классам антибиотиков характеризуются представители серотипов 23, 19 и 6 [55, 58]. Наиболее часто инвазивные формы у детей до 5 лет вызывают серотипы 4, 6, 9, 14, 18, 19 и 23, в остальных возрастных группах преобладают 4, 6, 9, 12, 14, 19 и 23 [55, 59, 60]. Особого внимания заслуживает информация о циркуляции в России серотипов 19F, 14, 9V/A, 15 A/F, 6 A/B/C/D, 3 и 23F [61–64], часть из них не представлена в составе современных вакцин (15 A/F/C, 6 C/D, 9A). Некоторые ассоциируются с определёнными клиническими формами. Так, серотипы 3 и 14 чаще вызывают пневмонии и плевриты с деструкцией лёгочной ткани [5, 65], серотипы 3 и 19F — острый средний

отит у детей. Г.В. Белошицкий и соавт. отметили, что серотипы 23F, 14, 19F и 3 могут стать причиной развития тяжёлых клинических форм менингита и приводить к летальным исходам [66].

Бактериальные штаммы внутри одного вида и даже подвида могут обладать направленной чувствительностью к фагам, что позволяет успешно использовать бактериофаги для воздействия на определённый биофар, серофар, фагофар. Одна из серьёзных проблем в борьбе с пневмококковой инфекцией состоит в сложности лабораторной диагностики *S. pneumoniae*, включая внутривидовую идентификацию возбудителя — важный элемент мониторинга за эпидемическим процессом. Основная трудность оценки серотипового пейзажа *S. pneumoniae* связана с отсутствием методов типирования, одновременно обладающих высокой специфичностью, чувствительностью, воспроизводимостью и низкой себестоимостью.

Наиболее известными способами серотипирования *S. pneumoniae* в настоящее время являются реакция набухания капсулы (по Нейфельду), тест латекс-агглютинации и ПЦР-серотипирование. При использовании перечисленных методов в ряде случаев имеют место перекрёстные реакции с антигенами представителей внутри семейства *Streptococcaceae* (*S. oralis*, *S. mitis* и др.) и даже между семействами (*Escherichia coli*, *Klebsiella* и др.) [67]. В связи с широким внедрением вакцинации от пневмококковой инфекции в последние годы происходит смена циркулирующих серотипов. Так, в работе 2021 г. Е.В. Никитиной и соавт. отмечено снижение эффективности метода капсульного ПЦР-серотипирования *S. pneumoniae* за последние 5 лет (2016–2021 гг.) со 100 до 41,6% [68].

Наряду с этим внутривидовая идентификация микроорганизмов с использованием бактериофагов берёт своё начало в 1960-е гг. Одним из первых типизируемых на фагофары видов микроорганизмов был *S. aureus*, использовался международный набор диагностических стафилококковых фагов Давидсона [69, 70]. На протяжении многих лет фаготипирование *S. aureus* помогло эффективно расшифровке эпидемических вспышек при стафилококковых пищевых токсикоинфекциях на предприятиях общественного питания и при зоокоммунальных инфекциях в медицинских организациях. Установлена различная лизирующая способность листерофагов [71].

Лизис отдельных серотипов бактериофагами наблюдали при внутривидовой идентификации *Enterobacter cloacae* [72]. Результаты исследований по фенотипированию *Acinetobacter baumannii* с изучением специфической активности ацинетобактерного бактериофага опубликованы О.С. Федотовой и соавт. [73]. Впервые авторами установлена специфичность ацинетобактерного бактериофага к отдельному сиквенс-типу *A. baumannii* (ST 1167).

Разработка и внедрение альтернативных лабораторных стратегий внутривидового типирования с использованием бактериофагов, направленных на повышение качества идентификации *S. pneumoniae*, является приоритетом в решении молекулярно-биологических и эпидемиологических задач, поскольку несёт значимый потенциал в изучении новых факторов вирулентности, патогенности и антибиотикорезистентности микроорганизмов. С их решением станут возможными глубокая оценка филогенетических связей внутри циркулирующей микробной популяции пневмококков и, как следствие, грамотное обоснование противоэпидемических и профилактических мероприятий при пневмококковой инфекции, включая вакцинопрофилактику. Одно из решений данной проблемы мы видим в разработке оригинального набора бактериофагов специфической направленности на актуальные серотипы или генотипы *S. pneumoniae*.

Заключение

Значимым направлением в области сохранения здоровья и качества жизни населения является борьба с пневмококковой инфекцией путём совершенствования средств и методов специфической профилактики, диагностики и лечения. В этой связи разработка нового антимикробного средства «Бактериофаг Пневмосoccus» с направленностью на отдельные серологические варианты актуальных клинических изолятов *Streptococcus pneumoniae*, циркулирующих на территории России, имеет высокую актуальность и соответствует основному направлению Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации⁶ в части перехода к персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения, в том числе за счёт рационального применения лекарственных препаратов (прежде всего антибактериальных). Организация научных исследований в этой области знаний позволит выявить новые закономерности циркуляции актуальных серологических вариантов *S. pneumoniae* на отдельных территориях. Существенный вклад в изучение биологии возбудителя внесут созданные в ходе исследований уникальные коллекции штаммов *S. pneumoniae* и штаммов бактерий-продуцентов пневмококковых бактериофагов, а также сами полученные литические фаги *S. pneumoniae* направленного действия. Изучение их структурно-функциональной организации будет способствовать расширению теоретических основ микробиологии для дальнейшего создания новой группы перспективных лекарственных, диагностических и профилактических

⁶ Утверждена Указом Президента Российской Федерации от 01.12.2016 № 642 «О Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации».

средств, что имеет важное народно-хозяйственное значение. Разработка инновационных лечебно-профилактических и диагностических препаратов на основе бактериофагов *S. pneumoniae* существенно снизит циркуляцию штаммов микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью и потребление антибиотиков, повысит качество лабораторной диагностики. Исключительно важное социальное значение обсуждаемая тема будет иметь для реабилитации пациентов от последствий постковидной пневмококковой инфекции, в целом окажет положительное влияние на снижение общего уровня заболеваемости и смертности населения от инфекционной патологии, сохранит здоровье и качество жизни, улучшит демографическую ситуацию в стране.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Голоднова С.О., Фельдблюм И.В., Семериков В.В., Николенко В.В., Захарова Ю.А. Распространенность носительства *Streptococcus pneumoniae* среди медицинских работников и оценка эффективности вакцинопрофилактики. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2014; (1): 50–4.
2. van Hoek A.J., Andrews N., Waight P.A., Stowe J., Gates P., George R., et al. The effect of underlying clinical conditions on the risk of developing invasive pneumococcal disease in England. *J. Infect.* 2012; (1): 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2012.02.017>
3. Баранов А., Намазова Л., Таточенко В. Пневмококковая инфекция и связанные с ней заболевания – серьезная проблема современного здравоохранения. *Педиатрическая фармакология*. 2008; 5(1): 7–12.
4. Синопальников А.И., Романовских А.Г. Рекомендации по ведению взрослых пациентов с инфекциями нижних дыхательных путей. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2012; 14(1): 4–16. <https://doi.org/10.15690/vramn.v69i7-8.1108>
5. Сидоренко С.В., Савинова Т.А., Ильина Е.Н., Сырочкина М.А. Популяционная структура пневмококков со сниженной чувствительностью к пенициллину и перспективы антипневмококковой вакцинации для сдерживания распространения антибактериальной резистентности. *Антибиотики и химиотерапия*. 2011; (5-6): 11–8.
6. Mayanskiy N., Kulichenko T., Alyabieva N., Brzhozovskaya E., Ponomarenko O., Savinova T., et al. Changing serotype distribution and resistance patterns among pediatric nasopharyngeal pneumococci collected in Moscow, 2010–2017. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2019; 94(4): 385–90. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.02.010>
7. Савинова Т.А., Филимонова О.Ю., Грудинина С.А., Сидоренко С.В. Генетическое разнообразие пенициллинустойчивых *Streptococcus pneumoniae*. *Журнал инфектологии*. 2009; 1(4): 66–71. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2009-1-4-66-71>
8. Цветкова И.А., Беланов С.С., Гостев В.В., Калиногорская О.С., Волкова М.О., Мохов А.С. и др. Клональная структура популяции изолятов *Streptococcus pneumoniae*, циркулирующих в России с 1980 по 2017 гг. *Антибиотики и химиотерапия*. 2019; (5-6): 22–31. <https://doi.org/10.24411/0235-2990-2019-100027>
9. Родигина А.М. *Пневмококковый бактериофаг и его применение для лечения ползучей язвы роговицы*. Пермь: Звезда; 1938.
10. Беляев И.А., Беляев А.М. Анализ экологических показателей микрофлоры носоглотки и их влияние на носительство инвазивных форм *Streptococcus pneumoniae*. *Медицина и экология*. 2017; (1): 78–88.
11. Беляева Е.В., Ермолина Г.Б., Кичикова В.В., Никифоров В.А. Исследование ассоциаций бактерий в микробиоценозе слизистой носоглотки практически здоровых людей. *Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского*. 2012; (2-3): 20–4.
12. Хуснутдинова Л.М. Модификация биологических свойств бактерий в условиях ассоциации индигенной и патогенной микрофлоры. *Вестник Оренбургского государственного университета*. 2006; (12): 11–5.
13. Fujimori I., Kikushima K., Hisamatsu K., Nozawa I., Goto R., Murakami Y. Interaction between oral alpha-streptococci and group A streptococci in patients with tonsillitis. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 1997; 106: 571–4. <https://doi.org/10.1177/000348949710600708>
14. Fujimori I., Yamada T. Incidence of alpha-streptococcus having inhibitory activity against beta-streptococcus in patients with tonsillitis. *Nihon Jibiinkoka Gakkai Kaiho*. 1992; 95(3): 400–8. <https://doi.org/10.3950/jibiinkoka.95.400> (in Japanese)
15. Dajani A.S., Tom M.C., Law D.J. Viridins, bacteriocins of alpha-hemolytic streptococci: isolation, characterization, and partial purification. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1976; 9(1): 81–8. <https://doi.org/10.1128/AAC.9.1.81>
16. Tzannetis S.E., Bigis A., Konidaris N., Ioannidis H., Genimatas V., Papavassiliou J. In-vitro bacteriocin-mediated antagonism by oral streptococci against human carrier strains of staphylococci. *J. Appl. Bacteriol.* 1991; 70(4): 294–301. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1991.tb02939.x>
17. Bisgaard H., Hermansen M.N., Buchvald F., Loland L., Halkjaer L.B., Bønnelykke K., et al. Childhood asthma after bacterial colonization of the airway in neonates. *N. Engl. J. Med.* 2007; 357(15): 1487–95. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa052632>
18. Gross E.L., Beall C.J., Kutsch S.R., Firestone N.D., Leys E.J., Griffen A.L. Beyond *Streptococcus mutans*: dental caries onset linked to multiple species by 16S rRNA community analysis. *PLoS One*. 2012; 7(10): e47722. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047722>
19. Roberts F.A., Darveau R.P. Microbial protection and virulence in periodontal tissue as a function of polymicrobial communities: symbiosis and dysbiosis. *Periodontol 2000*. 2015; 69(1): 18–27. <https://doi.org/10.1111/prd.12087>
20. Акимкин В.Г., Алимов А.В., Поляков В.С. Эпидемиологическая эффективность применения бактериофагов для профилактики острых респираторных инфекций бактериальной этиологии в организованных коллективах. *Бактериология*. 2016; 1(1): 80–7. <https://doi.org/10.20953/2500-1027-2016-1-80-87>
21. Kot W., Sabri M., Gingras H., Ouellette M., Tremblay D.M., Moineau S. Complete genome sequence of *Streptococcus pneumoniae* virulent Phage MS1. *Genome Announc.* 2017; 5(28): 4–5. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00333-17>
22. Martin-Galiano A.J., García E. *Streptococcus pneumoniae*: a plethora of temperate bacteriophages with a role in host genome rearrangement. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2021; 11: 775402. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.775402>
23. McDonnell M., Ronda C., Tomasz A. “Diplophage”: a bacteriophage of *Diplococcus pneumoniae*. *Virology*. 1975; 63(2): 577–82. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(75\)90329-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(75)90329-3)
24. Ouennane S., Leprohon P., Moineau S. Diverse virulent pneumophages infect *Streptococcus mitis*. *PLoS One*. 2015; 10(2): e0118807. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118807>
25. Lopez R., Ronda C., Tomasz A., Portoles A. Properties of

- "diphage": a lipid-containing bacteriophage. *J. Virol.* 1977; 24(1): 201–10. <https://doi.org/10.1128/jvi.24.1.201-210.1977>
27. Lopez R., Garcia E., Garcia P., Ronda C., Tomasz A. Choline-containing bacteriophage receptors in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 1982; 151(3): 1581–90. <https://doi.org/10.1128/jb.151.3.1581-1590.1982>
 28. Rosenow C., Ryan P., Weiser J.N., Johnson S., Fontan P., Ortvist A., et al. Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 1997; 25(5): 819–29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1997.mmi494.x>
 29. Luo R., Mann B., Lewis W.S., Rowe A., Heath R., Stewart M.L., et al. Solution structure of choline binding protein A, the major adhesin of *Streptococcus pneumoniae*. *EMBO J.* 2005; 24(1): 34–43. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600490>
 30. Marks L.R., Parameswaran G.I., Hakansson A.P. Pneumococcal interactions with epithelial cells are crucial for optimal biofilm formation and colonization in vitro and in vivo. *Infect. Immun.* 2012; 80(8): 2744–60. <https://doi.org/10.1128/IAI.00488-12>
 31. Sabri M., Häuser R., Ouellette M., Liu J., Dehbi M., Moeck G., et al. Genome annotation and intraviral interactome for the *Streptococcus pneumoniae* virulent phage Dp-1. *J. Bacteriol.* 2011; 193(2): 551–62. <https://doi.org/10.1128/JB.01117-10>
 32. Ronda C., López R., García E. Isolation and characterization of a new bacteriophage, Cp-1, infecting *Streptococcus pneumoniae*. *J. Virol.* 1981; 40(2): 551–9. <https://doi.org/10.1128/JVI.40.2.551-559.1981>
 33. Ronda C., García J.L., López R. Infection of *Streptococcus oralis* NCTC 11427 by pneumococcal phages. *FEMS Microbiol. Lett.* 1989; 53(1-2): 187–92. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1989.tb03620.x>
 34. Martín A.C., López R., García P. Analysis of the complete nucleotide sequence and functional organization of the genome of *Streptococcus pneumoniae* bacteriophage Cp-1. *J. Virol.* 1996; 70(6): 3678–87. <https://doi.org/10.1128/JVI.70.6.3678-3687.1996>
 35. Obregón V., García J.L., García E., López R., García P. Genome organization and molecular analysis of the temperate bacteriophage MM1 of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 2003; 185(7): 2362–8. <https://doi.org/10.1128/JB.185.7.2362-2368.2003>
 36. Gindreau E., López R., García P. MM1, a temperate bacteriophage of the type 23F Spanish/USA multiresistant epidemic clone of *Streptococcus pneumoniae*: structural analysis of the site-specific integration system. *J. Virol.* 2000; 74(17): 7803–13. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.17.7803-7813.2000>
 37. Loeffler J.M., Fischetti V.A. Lysogeny of *Streptococcus pneumoniae* with MM1 phage: improved adherence and other phenotypic changes. *Infect. Immun.* 2006; 74(8): 4486–95. <https://doi.org/10.1128/IAI.00020-06>
 38. Díaz E., López R., García J.L. EJ-1, a temperate bacteriophage of *Streptococcus pneumoniae* with a Myoviridae morphotype. *J. Bacteriol.* 1992; 174(17): 5516–25. <https://doi.org/10.1128/JB.174.17.5516-5525.1992>
 39. Díaz E., López R., García J.L. Role of the major pneumococcal autolysin in the atypical response of a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 1992; 174(17): 5508–15. <https://doi.org/10.1128/JB.174.17.5508-5515.1992>
 40. Romero P., López R., García E. Genomic organization and molecular analysis of the inducible prophage EJ-1, a mosaic myovirus from an atypical pneumococcus. *Virology.* 2004; 322(2): 239–52. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.01.029>
 41. Sheehan M.M., García J.L., Lopez R., García P. The lytic enzyme of pneumococcal phage Dp-1: a chimeric lysine of intergeneric origin. *Mol. Microbiol.* 1997; 25(4): 717–25. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.5101880.x>
 42. Monterroso B., Sáiz J.L., García P., García J.L., Menéndez M. Insights into the structure-function relationships of pneumococcal cell wall lysozymes, LytC and Cpl-1. *J. Biol. Chem.* 2008; 283(42): 28618–28. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802808200>
 43. Young R. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *Microbiol. Rev.* 1992; 56(3): 430–81. <https://doi.org/10.1128/MR.56.3.430-481.1992>
 44. Wang I.N., Smith D.L., Young R. Holins: the protein clocks of bacteriophage infections. *Annu. Rev. Microbiol.* 2000; 54: 799–825. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.799>
 45. Jado I., López R., García E., Fenoll A., Casal J., García P. Spanish Pneumococcal Infection Study Network. Phage lytic enzymes as therapy for antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* infection in a murine sepsis model. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003; 52(6): 967–73. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg485>
 46. Vouillamoz J., Entenza J.M., Giddey M., Fischetti V.A., Moreillon P., Resch G. Bactericidal synergism between daptomycin and the phage lysin Cpl-1 in a mouse model of pneumococcal bacteraemia. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2013; 42(5): 416–21. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.06.020>
 47. Harhala M., Nelson D.C., Miernikiewicz P., Heselphoth R.D., Brzezicka B., Majewska J., et al. Safety studies of pneumococcal endolysins Cpl-1 and Pal. *Viruses.* 2018; 10(11): 638. <https://doi.org/10.3390/v10110638>
 48. Leprohon P., Gingras H., Ouenne S., Moineau S., Ouellette M. A genomic approach to understand interactions between *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. *BMC Genomics.* 2015; 18(16): 972. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2134-8>
 49. Avery O.T., Macleod C.M., McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J. Exp. Med.* 1944; 79(2): 137–58. <https://doi.org/10.1084/jem.79.2.137>
 50. Manso A.S., Chai M.H., Atack J.M., Furi L., De Ste Croix M., Haigh R., et al. A random six-phase switch regulates pneumococcal virulence via global epigenetic changes. *Nat. Commun.* 2014; 5: 5055. <https://doi.org/10.1038/ncomms6055>
 51. Weiser J.N., Austrian R., Sreenivasan P.K., Masure H.R. Phase variation in pneumococcal opacity: relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonization. *Infect. Immun.* 1994; 62(6): 2582–9. <https://doi.org/10.1128/IAI.62.6.2582-2589.1994>
 52. Kim J.O., Weiser J.N. Association of intrastrain phase variation in quantity of capsular polysaccharide and teichoic acid with the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* 1998; 177(20): 368–77. <https://doi.org/10.1086/514205>
 53. Messaoudi M., Milenkov M., Albrich W.C., van der Linden M.P.G., Bénét T., Chou M., et al. The relevance of a novel quantitative assay to detect up to 40 major *Streptococcus pneumoniae* serotypes directly in clinical nasopharyngeal and blood specimens. *PLoS ONE.* 2016; 11(3): e0151428. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151428>
 54. Зарипова А.З., Баязитова Л.Т., Топкина О.Ф., Чазова Т.А., Тюрин Ю.А., Исаева Г.Ш. и др. Фенотипические и генотипические свойства *Streptococcus pneumoniae* при бактерионосительстве. *Практическая медицина.* 2018; 16(9): 106–12.
 55. Feldman C., Anderson R. Epidemiology, virulence factors and management of the pneumococcus. *F1000Res.* 2016; 5: 2320. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9283.1>
 56. Зайцев А.А., Акимкин В.Г., Брико Н.И. Вакцинопрофилактика пневмококковых инфекций: в фокусе взрослые из организованных коллективов. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы.* 2018; (4): 72–81. <https://doi.org/10.18565/epidem.2018.4.72-81>
 57. Протасова И.Н., Бахарева Н.В., Перьянова О.В., Елистратова Т.А., Коваль М.В. Смена серотипов *Streptococcus pneumoniae* у детей, вакцинированных 7-валентной конъюгированной вакциной. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2014; (5): 67–71.

ОБЗОРЫ

58. Намазова-Баранова Л.С., Федосеенко М.В., Вишнёва Е.А., Селимзянова Л.Р., Чемакина Д.С. Теоретические основы и реальные результаты: обзор материалов по вакцинопрофилактике пневмококковой инфекции в мире. *Педиатрическая фармакология*. 2018; 15(1): 58–74. <https://doi.org/10.15690/pf.v15i1.1844>

59. Брико Н.И., Коршунов В.А., Ломоносов К.С. Пневмококковая инфекция в Российской Федерации: состояние проблемы. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2021; (1): 28–42. <https://doi.org/10.15690/vramn1404>

60. Козлов Р.С., Чагарян А.Н., Козлова Л.В., Муравьев А.А. Серологическая характеристика и чувствительность к антибиотикам пневмококков, выделенных у детей в возрасте до 5 лет в отдельных регионах Российской Федерации. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2001; 13(2): 177–87.

61. Голубкова А.А., Сомова А.В. Роль *Streptococcus pneumoniae* в этиологии внебольничных пневмоний в крупном промышленном регионе Российской Федерации. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2018; (3): 29–33. <https://doi.org/10.17238/PmJ1609-1175.2018.3.29-33>

62. van Gils E.J., Veenhoven R.H., Hak E., Rodenburg G.D., Keijzers W.C., Bogaert D., et al. Pneumococcal conjugate vaccination and nasopharyngeal acquisition of pneumococcal serotype 19A strains. *JAMA*. 2010; 304(10): 1099–106. <https://doi.org/10.1001/jama.2010.1290>

63. Reinert R.R. The antimicrobial resistance profile of *Streptococcus pneumoniae*. *Clin. Microbiol. Infect.* 2009; 3: 7–11. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02724.x>

64. Reinert R.R., Paradiso P., Fritzell B. Advances in pneumococcal vaccines: The 13-valent pneumococcal conjugate vaccine received market authorization in Europe. *Expert Rev. Vaccines*. 2010; 9(3): 229–36. <https://doi.org/10.1586/erv.10.6>

65. Белошицкий Г.В., Королева И.С., Королева М.А. Серотиповой пейзаж пневмококков, выделенных при пневмококковом менингите, в Российской Федерации. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2015; 14(2): 19–25. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2015-14-2-19-25>

66. Slotved H.C., Kaltoft M., Skovsted I.C., Kerrn M.B., Espersen F. Simple, rapid latex agglutination test for serotyping of pneumococci (Pneumotest-Latex). *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(6): 2518–22. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.6.2518-2522.2004>

67. Никитина Е.В., Цветкова И.А., Калиногорская О.С., Гостев В.В., Беланов С.С., Мохов А.С. и др. Серотиповый состав *Streptococcus pneumoniae*, циркулирующих у детей с респираторными инфекциями, оптимизация молекулярных методов оценки. *Антибиотики и химиотерапия*. 2021; (11-12): 18–24. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2021-66-11-12-18-24>

68. Davidson I. A collaborative investigation of phages for typing bovine staphylococci. *Bull. World Health Organ.* 1972; 46(1): 81–98.

69. Blair J.E., Williams R.E.O. Phage typing of staphylococci. *Bull. World Health Organ.* 1961; 24: 771–84.

70. Vongkamjan K., Switt A.M., den Bakker H.C., Fortes E.D., Wiedmann M. Silage collected from dairy farms harbors an abundance of listeriophages with considerable host range and genome size diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012; 78(24): 8666–75. <https://doi.org/10.1128/AEM.01859-12>

71. Gaston M.A. Isolation and selection of a bacteriophage-typing set for *Enterobacter cloacae*. *J. Med. Microbiol.* 1987; 24(4): 285–90. <https://doi.org/10.1099/00222615-24-4-285>

72. Федотова О.С., Захарова Ю.А., Остапчук А.В., Бажанова У.А., Захаров А.А. Фенотипический профиль актуальных полирезистентных сикквенса-типов (ST 1167, ST 944, ST 208 *Acinetobacter baumannii*). *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021; 98(6): 639–47. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-170>

REFERENCES

1. Golodnova S.O., Fel'dblyum I.V., Semerikov V.V., Nikolenko V.V., Zakharova Yu.A. The prevalence of carriage of *Streptococcus pneumoniae* among medical specialists and evaluation of their vaccination. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika*. 2014; (1): 50–4. (in Russian)

2. van Hoek A.J., Andrews N., Waight P.A., Stowe J., Gates P., George R., et al. The effect of underlying clinical conditions on the risk of developing invasive pneumococcal disease in England. *J. Infect.* 2012; (1): 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2012.02.017>

3. Baranov A., Namazova L., Tatchenko V. Pneumococcal infection and associated diseases - a serious problem of modern health care. *Pediatricheskaya farmakologiya*. 2008; 5(1): 7–12. (in Russian)

4. Sinopal'nikov A.I., Romanovskikh A.G. The management of lower respiratory tract infections in adult patients. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2012; 14(1): 4–16. (in Russian)

5. Mayanskiy N.A., Alyab'eva N.M., Lazareva A.V., Katosova L.K. Serotype diversity and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae*. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2014; (7-8): 38–45. <https://doi.org/10.15690/vramn.v69i7-8.1108> (in Russian)

6. Sidorenko S.V., Savinova T.A., Il'ina E.N., Syrochkina M.A. Population pattern of pneumococci with lower susceptibility to penicillin and prospects of antipneumococcal vaccination to control antibiotic resistance distribution. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2011; (5-6): 11–8. (in Russian)

7. Mayanskiy N., Kulichenko T., Alyabieva N., Brzhozovskaya E., Ponomarenko O., Savinova T., et al. Changing serotype distribution and resistance patterns among pediatric nasopharyngeal pneumococci collected in Moscow, 2010–2017. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2019; 94(4): 385–90. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.02.010>

8. Savinova T.A., Filimonova O.Yu., Grudinina S.A., Sidorenko S.V. Genetic diversity of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Zhurnal infektologii*. 2009; 1(4): 66–71. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2009-1-4-66-71> (in Russian)

9. Tsvetkova I.A., Belanov S.S., Gostev V.V., Kalinogorskaya O.S., Volkova M.O., Mokhov A.S., et al. Clonality of *Streptococcus pneumoniae* isolates in Russia, circulating from 1980 to 2017. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2019; (5-6): 22–31. <https://doi.org/10.24411/0235-2990-2019-100027> (in Russian)

10. Rodigina A.M. *Pneumococcal Bacteriophage and Its Use in the Treatment Creeping Ulcer of the Cornea [Pneumokokkovyy bakteriofag i ego primeneniye dlya lecheniya polzuchey yazvy rogovitsy]*. Perm': Zvezda; 1938. (in Russian)

11. Belyaev I.A., Belyaev A.M. Analysis of environmental indices of nasopharynx microflora and their influence on the carriage of *Streptococcus pneumoniae* invasive forms. *Medsina i ekologiya*. 2017; (1): 78–88. (in Russian)

12. Belyaeva E.V., Ermolina G.B., Kichikova V.V., Nikiforov V.A. A study of bacteria associations in the microbiocenosis of nasopharynx of practically healthy persons. *Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo*. 2012; (2-3): 20–4. (in Russian)

13. Khusnutdinova L.M. Modification of the biological properties of bacteria under conditions of association of indigenous and pathogenic microflora. *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvenno-go universiteta*. 2006; (12): 11–5. (in Russian)

14. Fujimori I., Kikushima K., Hisamatsu K., Nozawa I., Goto R., Murakami Y. Interaction between oral alpha-streptococci and group A streptococci in patients with tonsillitis. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 1997; 106: 571–4. <https://doi.org/10.1177/000348949710600708>


15. Fujimori I., Yamada T. Incidence of alpha-streptococcus having inhibitory activity against beta-streptococcus in patients with

- tonsillitis. *Nihon Jibiinkoka Gakkai Kaiho*. 1992; 95(3): 400–8. <https://doi.org/10.3950/jibiinkoka.95.400> (in Japanese)
16. Dajani A.S., Tom M.C., Law D.J. Viridins, bacteriocins of alpha-hemolytic streptococci: isolation, characterization, and partial purification. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1976; 9(1): 81–8. <https://doi.org/10.1128/AAC.9.1.81>
 17. Tzannetis S.E., Bigis A., Konidaris N., Ioannidis H., Genimatas V., Papavassiliou J. In-vitro bacteriocin-mediated antagonism by oral streptococci against human carrier strains of staphylococci. *J. Appl. Bacteriol.* 1991; 70(4): 294–301. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1991.tb02939.x>
 18. Bisgaard H., Hermansen M.N., Buchvald F., Loland L., Halkjaer L.B., Bønnelykke K., et al. Childhood asthma after bacterial colonization of the airway in neonates. *N. Engl. J. Med.* 2007; 357(15): 1487–95. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa052632>
 19. Gross E.L., Beall C.J., Kutsch S.R., Firestone N.D., Leys E.J., Griffen A.L. Beyond *Streptococcus mutans*: dental caries onset linked to multiple species by 16S rRNA community analysis. *PLoS One*. 2012; 7(10): e47722. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047722>
 20. Roberts F.A., Darveau R.P. Microbial protection and virulence in periodontal tissue as a function of polymicrobial communities: symbiosis and dysbiosis. *Periodontol* 2000. 2015; 69(1): 18–27. <https://doi.org/10.1111/prd.12087>
 21. Akimkin V.G., Alimov A.V., Polyakov V.S. The epidemiological efficiency of the use of bacteriophages for prevention of acute respiratory bacterial infections in organized groups. *Bakteriologiya*. 2016; 1(1): 80–7. <https://doi.org/10.20953/2500-1027-2016-1-80-87> (in Russian)
 22. Kot W., Sabri M., Gingras H., Ouellette M., Tremblay D.M., Moineau S. Complete genome sequence of *Streptococcus pneumoniae* virulent Phage MS1. *Genome Announc.* 2017; 5(28): 4–5. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00333-17>
 23. Martín-Galiano A.J., García E. Streptococcus pneumoniae: a plethora of temperate bacteriophages with a role in host genome rearrangement. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2021; 11: 775402. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.775402>
 24. McDonnell M., Ronda C., Tomasz A. “Diplophage”: a bacteriophage of *Diplococcus pneumoniae*. *Virology*. 1975; 63(2): 577–82. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(75\)90329-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(75)90329-3)
 25. Ouennane S., Leprohon P., Moineau S. Diverse virulent pneumophages infect *Streptococcus mitis*. *PLoS One*. 2015; 10(2): e0118807. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118807>
 26. Lopez R., Ronda C., Tomasz A., Portoles A. Properties of “diplophage”: a lipid-containing bacteriophage. *J. Virol.* 1977; 24(1): 201–10. <https://doi.org/10.1128/jvi.24.1.201-210.1977>
 27. Lopez R., García E., García P., Ronda C., Tomasz A. Choline-containing bacteriophage receptors in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 1982; 151(3): 1581–90. <https://doi.org/10.1128/jb.151.3.1581-1590.1982>
 28. Rosenow C., Ryan P., Weiser J.N., Johnson S., Fontan P., Ortvist A., et al. Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 1997; 25(5): 819–29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1997.mmi494.x>
 29. Luo R., Mann B., Lewis W.S., Rowe A., Heath R., Stewart M.L., et al. Solution structure of choline binding protein A, the major adhesin of *Streptococcus pneumoniae*. *EMBO J.* 2005; 24(1): 34–43. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600490>
 30. Marks L.R., Parameswaran G.I., Hakansson A.P. Pneumococcal interactions with epithelial cells are crucial for optimal biofilm formation and colonization *in vitro* and *in vivo*. *Infect. Immun.* 2012; 80(8): 2744–60. <https://doi.org/10.1128/IAI.00488-12>
 31. Sabri M., Häuser R., Ouellette M., Liu J., Dehbi M., Moeck G, et al. Genome annotation and intraviral interactome for the *Streptococcus pneumoniae* virulent phage Dp-1. *J. Bacteriol.* 2011; 193(2): 551–62. <https://doi.org/10.1128/JB.01117-10>
 32. Ronda C., López R., García E. Isolation and characterization of a new bacteriophage, Cp-1, infecting *Streptococcus pneumoniae*. *J. Virol.* 1981; 40(2): 551–9. <https://doi.org/10.1128/JVI.40.2.551-559.1981>
 33. Ronda C., García J.L., López R. Infection of *Streptococcus oralis* NCTC 11427 by pneumococcal phages. *FEMS Microbiol. Lett.* 1989; 53(1-2): 187–92. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1989.tb03620.x>
 34. Martín A.C., López R., García P. Analysis of the complete nucleotide sequence and functional organization of the genome of *Streptococcus pneumoniae* bacteriophage Cp-1. *J. Virol.* 1996; 70(6): 3678–87. <https://doi.org/10.1128/JVI.70.6.3678-3687.1996>
 35. Obregón V., García J.L., García E., López R., García P. Genome organization and molecular analysis of the temperate bacteriophage MM1 of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 2003; 185(7): 2362–8. <https://doi.org/10.1128/JB.185.7.2362-2368.2003>
 36. Gindreau E., López R., García P. MM1, a temperate bacteriophage of the type 23F Spanish/USA multiresistant epidemic clone of *Streptococcus pneumoniae*: structural analysis of the site-specific integration system. *J. Virol.* 2000; 74(17): 7803–13. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.17.7803-7813.2000>
 37. Loeffler J.M., Fischetti V.A. Lysogeny of *Streptococcus pneumoniae* with MM1 phage: improved adherence and other phenotypic changes. *Infect. Immun.* 2006; 74(8): 4486–95. <https://doi.org/10.1128/IAI.00020-06>
 38. Díaz E., López R., García J.L. EJ-1, a temperate bacteriophage of *Streptococcus pneumoniae* with a *Myoviridae* morphotype. *J. Bacteriol.* 1992; 174(17): 5516–25. <https://doi.org/10.1128/JB.174.17.5516-5525.1992>
 39. Díaz E., López R., García J.L. Role of the major pneumococcal autolysin in the atypical response of a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 1992; 174(17): 5508–15. <https://doi.org/10.1128/JB.174.17.5508-5515.1992>
 40. Romero P., López R., García E. Genomic organization and molecular analysis of the inducible prophage EJ-1, a mosaic myovirus from an atypical *Pneumococcus*. *Virology*. 2004; 322(2): 239–52. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.01.029>
 41. Sheehan M.M., García J.L., Lopez R., García P. The lytic enzyme of pneumococcal phage Dp-1: a chimeric lysine of intergeneric origin. *Mol. Microbiol.* 1997; 25(4): 717–25. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.5101880.x>
 42. Monterroso B., Sáiz J.L., García P., García J.L., Menéndez M. Insights into the structure-function relationships of pneumococcal cell wall lysozymes, LytC and Cpl-1. *J. Biol. Chem.* 2008; 283(42): 28618–28. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802808200>
 43. Young R. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *Microbiol. Rev.* 1992; 56(3): 430–81. <https://doi.org/10.1128/MR.56.3.430-481.1992>
 44. Wang I.N., Smith D.L., Young R. Holins: the protein clocks of bacteriophage infections. *Annu. Rev. Microbiol.* 2000; 54: 799–825. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.799>
 45. Jado I., López R., García E., Fenoll A., Casal J., García P. Spanish Pneumococcal Infection Study Network. Phage lytic enzymes as therapy for antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* infection in a murine sepsis model. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003; 52(6): 967–73. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg485>
 46. Vouillamoz J., Entenza J.M., Giddey M., Fischetti V.A., Moreillon P., Resch G. Bactericidal synergism between daptomycin and the phage lysin Cpl-1 in a mouse model of pneumococcal bacteraemia. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2013; 42(5): 416–21. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.06.020>
 47. Harhala M., Nelson D.C., Miernikiewicz P., Heselpoth R.D., Brzezicka B., Majewska J., et al. Safety studies of pneumococ-

ОБЗОРЫ

- cal endolysins Cpl-1 and Pal. *Viruses*. 2018; 10(11): 638. <https://doi.org/10.3390/v10110638>
48. Leprohon P., Gingras H., Ouenne S., Moineau S., Ouellette M. A genomic approach to understand interactions between *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. *BMC Genomics*. 2015; 18(16): 972. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2134-8>
49. Avery O.T., Macleod C.M., McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of *Pneumococcal* types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. *J. Exp. Med.* 1944; 79(2): 137–58. <https://doi.org/10.1084/jem.79.2.137>
50. Manso A.S., Chai M.H., Atack J.M., Furi L., De Ste Croix M., Haigh R., et al. A random six-phase switch regulates pneumococcal virulence via global epigenetic changes. *Nat. Commun.* 2014; 5: 5055. <https://doi.org/10.1038/ncomms6055>
51. Weiser J.N., Austrian R., Sreenivasan P.K., Measure H.R. Phase variation in pneumococcal opacity: relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonization. *Infect. Immun.* 1994; 62(6): 2582–9. <https://doi.org/10.1128/IAI.62.6.2582-2589.1994>
52. Kim J.O., Weiser J.N. Association of intrastain phase variation in quantity of capsular polysaccharide and teichoic acid with the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* 1998; 177(20): 368–77. <https://doi.org/10.1086/514205>
53. Messaoudi M., Milenkov M., Albrich W.C., van der Linden M.P.G., Bénét T., Chou M., et al. The relevance of a novel quantitative assay to detect up to 40 major *Streptococcus pneumoniae* serotypes directly in clinical nasopharyngeal and blood specimens. *PLoS ONE*. 2016; 11(3): e0151428. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151428>
54. Zaripova A.Z., Bayazitova L.T., Tyupkina O.F., Chazova T.A., Tyurin Yu.A., Isaeva G.Sh., et al. Phenotypic and genotypic properties of *Streptococcus pneumoniae* in case of bacteria carrying. *Prakticheskaya meditsina*. 2018; 16(9): 106–12. (in Russian)
55. Feldman C., Anderson R. Epidemiology, virulence factors and management of the *Pneumococcus*. *F1000Res*. 2016; 5: 2320 <https://doi.org/10.12688/f1000research.9283.1>
56. Zaytsev A.A., Akimkin V.G., Briko N.I. Vaccines for the prevention of pneumococcal infections: a case study of adults from organized collectives. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy*. 2018; (4): 72–81. <https://doi.org/10.18565/epidem.2018.4.72-81> (in Russian)
57. Protasova I.N., Bakhareva N.V., Per'yanova O.V., Elistratova T.A., Koval' M.V. Changing *Streptococcus pneumoniae* serotypes in children vaccinated with 7-valent conjugate vaccine. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika*. 2014; (5): 67–71. (in Russian)
58. Namazova-Baranova L.S., Fedoseenko M.V., Vishneva E.A., Selimzyanova L.R., Chemakina D.S. Theoretical background and real results: a data review on vaccine prevention of pneumococcal infection in the world. *Pediatricheskaya farmakologiya*. 2018; 15(1): 58–74. <https://doi.org/10.15690/pf.v15i1.1844> (in Russian)
59. Briko N.I., Korshunov V.A., Lomonosov K.S. Pneumococcal infection in Russia: state of the issue. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2021; (1): 28–42. <https://doi.org/10.15690/vramn1404> (in Russian)
60. Kozlov R.S., Chagaryan A.N., Kozlova L.V., Murav'ev A.A. Serological characteristics and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolated from children 0–5 years of age in different regions of Russia. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2001; 13(2): 177–87. (in Russian)
61. Golubkova A.A., Somova A.V. Role of *Streptococcus pneumoniae* in the etiology of community-acquired pneumonia in a large industrial region of the Russian Federation. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2018; (3): 29–33. <https://doi.org/10.17238/PmJ1609-1175.2018.3.29-33> (in Russian)
62. van Gils E.J., Veenhoven R.H., Hak E., Rodenburg G.D., Keijzers W.C., Bogaert D., et al. *Pneumococcal* conjugate vaccination and nasopharyngeal acquisition of pneumococcal serotype 19A strains. *JAMA*. 2010; 304(10): 1099–106. <https://doi.org/10.1001/jama.2010.1290>
63. Reinert R.R. The antimicrobial resistance profile of *Streptococcus pneumoniae*. *Clin. Microbiol. Infect.* 2009; 3: 7–11. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02724.x>
64. Reinert R.R., Paradiso P., Fritzell B. Advances in pneumococcal vaccines: The 13-valent pneumococcal conjugate vaccine received market authorization in Europe. *Expert Rev. Vaccines*. 2010; 9(3): 229–36. <https://doi.org/10.1586/erv.10.6>
65. Beloshitskiy G.V., Koroleva I.S., Koroleva M.A. Landscape of serotypes *Pneumococcus* isolate with pneumococcal meningitis in the Russian Federation. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika*. 2015; 14(2): 19–25. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2015-14-2-19-25> (in Russian)
66. Slotved H.C., Kalsoft M., Skovsted I.C., Kerrn M.B., Espersen F. Simple, rapid latex agglutination test for serotyping of *Pneumococci* (Pneumotest-Latex). *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(6): 2518–22. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.6.2518-2522.2004>
67. Nikitina E.V., Tsvetkova I.A., Kalinogorskaya O.S., Gostev V.V., Belanov S.S., Mokhov A.S., et al. Serotype composition of *Streptococcus pneumoniae* in children with respiratory infections, optimization of molecular assessment methods. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2021; (11-12): 18–24. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2021-66-11-12-18-24> (in Russian)
68. Davidson I. A collaborative investigation of phages for typing bovine *Staphylococci*. *Bull. World Health Organ.* 1972; 46(1): 81–98.
69. Blair J.E., Williams R.E.O. Phage typing of *Staphylococci*. *Bull. World Health Organ.* 1961; 24: 771–84.
70. Vongkamjan K., Switt A.M., den Bakker H.C., Fortes E.D., Wiedmann M. Silage collected from dairy farms harbors an abundance of listeriophages with considerable host range and genome size diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012; 78(24): 8666–75. <https://doi.org/10.1128/AEM.01859-12>
71. Gaston M.A. Isolation and selection of a bacteriophage-typing set for *Enterobacter cloacae*. *J. Med. Microbiol.* 1987; 24(4): 285–90. <https://doi.org/10.1099/00222615-24-4-285>
72. 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). *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021; 98(6): 639–47. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-170> (in Russian)

Информация об авторах

Захарова Юлия Александровна  — д.м.н., доц., рук. отдела эпидемиологии вирусных инфекций ЕНИИВИ ГНЦ ВБ «Вектор», Екатеринбург, Россия, zakharova_ya@eniivi.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3416-0902>


Иващенко Иван Александрович — старший лаборант лаб. респираторных вирусных инфекций отдела эпидемиологии вирусных инфекций ЕНИИВИ ГНЦ ВБ «Вектор», Екатеринбург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3584-9528>

Болгарова Екатерина Викторовна — н.с. лаб. респираторных вирусных инфекций отдела эпидемиологии вирусных инфекций ЕНИИВИ ГНЦ ВБ «Вектор», Екатеринбург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6140-2546>

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 31.08.2022;
принята к публикации 19.10.2022;
опубликована 30.10.2022

Information about the authors

Yuliya A. Zakharova  — D. Sci. (Med.), Associate Professor, Head, Department of epidemiology of viral infections, Yekaterinburg 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>

Ivan A. Ivashchenko — senior laboratory assistant, Laboratory of respiratory viral infections, Department of epidemiology of viral infections, Yekaterinburg Research Institute of Viral Infections, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Yekaterinburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3584-9528>

Ekaterina V. Bolgarova — researcher, Laboratory of respiratory viral infections, Department of epidemiology of viral infections, Yekaterinburg Research Institute of Viral Infections, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Yekaterinburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6140-2546>

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 31.08.2022;
accepted for publication 19.10.2022;
published 30.10.2022



Анатомо-физиологические аспекты патогенеза ВИЧ-инфекции у животных моделей

Нагорных А.М.[✉], Тюменцева М.А., Тюменцев А.И., Акимкин В.Г.

Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Аннотация

Понимание всего патогенеза ВИЧ-инфекции — от проникновения инфекции до индукции тяжёлого иммунодефицита — важно для разработки новых методов лечения. Неполные 40 лет исследований механизмов ВИЧ-инфекции, приводящих к развитию синдрома приобретённого иммунодефицита (СПИДа), собрали колоссальное количество информации, однако собственная уникальная изменчивость ВИЧ выявляет все новые пробелы.

Несмотря на постоянное усовершенствование протоколов антиретровирусной терапии и успехи её применения, остановить распространение ВИЧ-инфекции пока не удаётся. Развитие новых протоколов и испытание новых групп антиретровирусных препаратов возможно, в первую очередь, благодаря совершенствованию животных моделей патогенеза ВИЧ-инфекции. Их релевантность, несомненно, повышается, но в то же время зависит от конкретных исследовательских задач, т.к. ни одна из моделей *in vivo* не может всесторонне имитировать механизм инфекционной патологии человека, приводящей к мультиорганному поражению.

Цель работы — представить актуальную информацию по известным животным моделям ВИЧ-инфекции, акцентируя внимание на способе их инфицирования и анатомо-физиологических и патологических особенностях.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, патогенез, животные модели ВИЧ-инфекции, обзор

Источник финансирования. Данная работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках гранта в форме субсидии на создание и развитие «Центра геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий», соглашение № 075-15-2019-1666.

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

Для цитирования: Нагорных А.М., Тюменцева М.А., Тюменцев А.И., Акимкин В.Г. Анатомо-физиологические аспекты патогенеза ВИЧ-инфекции у животных моделей. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(5):587–604.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-307>

Anatomical and physiological aspects of the HIV infection pathogenesis in animal models

Aleksey M. Nagornykh[✉], Marina A. Tyumentseva, Alexandr I. Tyumentsev, Vasily G. Akimkin

Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia

Abstract

Understanding the entire pathogenesis of HIV infection, from penetration at the gates of infection to the induction of severe immunodeficiency, is an essential tool for the development of new treatment methods. Less than 40 years of research into the mechanisms of HIV infection that lead to the development of acquired immunodeficiency syndrome have accumulated a huge amount of information, but HIV's own unique variability identifies new whitespaces.

Despite the constant improvement of the protocols of antiretroviral therapy and the success of its use, it has not yet been possible to stop the spread of HIV infection. The development of new protocols and the testing of new groups of antiretroviral drugs is possible, first of all, due to the improvement of animal models of the HIV infection pathogenesis. Their relevance, undoubtedly increases, but still depends on specific research tasks, since none of the *in vivo* models can comprehensively simulate the mechanism of the infection pathology in humans which leads to multi-organ damage.

The aim of the review was to provide up-to-date information on known animal models of HIV infection, focusing on the method of their infection and anatomical, physiological and pathological features.

Keywords: *HIV infection, pathogenesis, animal models of HIV infection, review*

Funding source. This work is supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of a grant in the form of a subsidy for the creation and development of the «World-class Genomic Research Center for Ensuring Biological Safety and Technological Independence under the Federal Scientific and Technical Program for the Development of Genetic Technologies», agreement No. 075-15-2019-1666.

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

For citation: Nagornykh A.M., Tyumentsev A.I., Tyumentseva M.A., Akimkin V.G. Anatomical and physiological aspects of the HIV infection pathogenesis in animal models. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(5):587–604.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-307>

Введение

ВИЧ является специфичным патогеном человека, инфицирование которым сопровождается повреждением и гибелью зрелых CD4⁺ Т-клеток (hCD4⁺) на периферии и незрелых гемопоэтических клеток-предшественников в продуцирующих их органах и тканях, включая костный мозг (КМ), тимус, головной мозг (ГМ) и лимфатические узлы (ЛУ) [1].

ВИЧ-1 передаётся перкутаным, перинатальным и половым путями, причём на последствия контакта поверхностями слизистых оболочек приходится 80% случаев инфицирования взрослых [2]. Недавние исследования продемонстрировали возможность ВИЧ инфицировать не только клетки иммунной системы, но и ткани многих органов, в том числе ГМ, кишечника, почек и предстательной железы [3, 4].

Использующие CCR5 (не образующие синцитий, CCR5-тропные, или R5-изоляты) штаммы ВИЧ-1 тропны к макрофагам [5, 6] и обнаруживаются в крови во время ранней или острой инфекции [7]. Они обладают высокой скоростью репликации, продуцируя большое количество вируса-потомства. Некоторые исследования дают основания предполагать, что первоначально инфицирующий вирус R5 часто эволюционирует в вирус R5/X4, обладающий двойной тропностью [8]. Последующее развитие СПИДа, сопровождаемое истощением Т-клеток памяти hCD4⁺, экспрессирующих CXCR4, в ЛУ, селезёнке, пейеровых бляшках, назально-ассоциированной лимфоидной ткани, аденоидах, миндалинах, бронхоассоциированной лимфоидной ткани, криптопатчах и изолированных лимфоидных фолликулах [6, 9–11], приводит к возникновению более цитопатичного вируса [8], использующего хемокиновый рецептор CXCR4 (образующий синцитий, CXCR4-тропный, или X4-изолят).

Незначительный уровень CCR5 экспрессируется в hCD4⁺ и hCD8⁺ тимоцитах, а также в подм-

ножестве циркулирующих клеток памяти или активированных CD4⁺ Т-клетках. С учетом этого дифференцирующего свойства, X4-изоляты, в отличие от R5-изолятов, быстро инфицируют и уничтожают как незрелые, так и зрелые Т-клетки, вызывая коллапс иммунной системы [12]. Несмотря на это, примерно в 50% случаев СПИДа обнаруживаются R5-изоляты [13].

Содержание в слизистых оболочках больше, чем в крови, количества hCD4⁺ Т-клеток [3, 4, 14] с изначально высокой степенью активации и экспрессии CCR5 делает их основным резервуаром клеток-мишеней ВИЧ-1 при контактном пути передачи [15]. Помимо этого, индукция хемокинов на ранних этапах заражения инициирует миграцию клеток-мишеней ВИЧ в область инфицирования и воспаления, скорее усиливая, чем предотвращая его распространение своей противовирусной активностью [16].

Независимо от пути передачи, основная локация репликации ВИЧ-1 и истощения hCD4⁺ Т-клеток — желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) [17]. Поэтому главным последствием острой ВИЧ-инфекции является масштабное разрушение hCD4⁺ Т-клеток лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистой оболочкой ЖКТ [18]. Кроме того, нарушение целостности эпителия ЖКТ, позволяющее бактериям проникать в кровь, может стать причиной воспаления и активации, способствующих дальнейшей потере hCD4⁺ клеток [19].

При отсутствии повреждений слизистой оболочки потенциальными способами проникновения ВИЧ являются транцитоз эпителия и транслокация вирусных частиц через эпителий [20, 21], а позже была продемонстрирована способность эндцитозной интернализации вирионов ВИЧ-1 клетками Лангерганса с последующей репликацией вирусных частиц в цитоплазме и предположительной инфекционностью для соседних hCD4⁺ Т-клеток [14].

Кроме того, сам по себе эпителий слизистой оболочки женского репродуктивного тракта (ЖРТ) является эффективным барьером против инфекции, поэтому не все воздействия ВИЧ-1 приводят к продуктивной инфекции [20].

Хотя основными мишенями ВИЧ-1 являются $hCD4^+$ Т-клетки, макрофаги и микроглия ГМ, лимфоидные ткани представляют собой главный резервуар для ВИЧ, компрометируя в основном латентно инфицированные покоящиеся $hCD4^+$ Т-клетки, несущие интегрированную, способную к репликации форму ВИЧ даже у пациентов, получающих антиретровирусную терапию (АРТ). Присутствие биомаркеров активации макрофагов и повреждения нейронов в ликворе ВИЧ-инфицированных пациентов с вирусной супрессией демонстрируют индукцию нейрокогнитивных расстройств посредством хронического воспаления тканей центральной нервной системы (ЦНС), представляя ткани ЦНС как скрытый резервуар вируса, способного к репликации [22]. Несмотря на то что покоящиеся $hCD4^+$ лимфоциты обладают низкой продуктивностью вирусной инфекции за счёт ингибирования ранней обратной транскрипции поступающих вирусных геномов, приводящая к образованию полностью заразной частицы ВИЧ выработка вируса запускается сразу после активации латентно инфицированных покоящихся $hCD4^+$ Т-клеток [23].

Хотя ВИЧ и размножается в организме шимпанзе (*Pan troglodytes*), вирус не способен инфицировать мышей, крыс, кроликов или макак [24, 25]. При этом видоспецифичность ВИЧ не ограничивается взаимодействием с CXCR4 или CCR5 на поверхности $hCD4^+$ Т-клеток. Многочисленные барьеры для репликации ВИЧ, обнаруженные у млекопитающих, ограничивают доступность адекватных животных моделей для изучения фундаментальных аспектов биологии ВИЧ и его взаимодействия с хозяином [16]. Так, клетки крыс или мышей, сконструированные для поверхностной экспрессии $hCD4$ и CCR5 либо CXCR4, не способны поддерживать репликацию ВИЧ, в том числе ввиду отсутствия дополнительных факторов вирусной рестрикции, таких как TRIM5 α и APOBEC3. Вирусный белок Vif взаимодействует непосредственно с APOBEC3 и предотвращает его активность, блокируя включение APOBEC3 в вирусные частицы [26, 27]. В свою очередь, TRIM5 α регулирует способность некоторых ретровирусов заражать клетки человека, а ВИЧ — клетки обезьян. Этот белок взаимодействует с вирусным капсидом и, блокируя процесс, предотвращает нарушение его целостности во время обратной транскрипции [28].

Важнейшей концепцией патогенеза ВИЧ является хроническая иммунная активация [29]. Гипериммунные реакции с выработкой провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухо-

ли- α , проявляющих цитотоксические свойства [30], и белки ВИЧ [23] могут усиливать степень репликации ВИЧ и апоптоз $hCD4^+$ и $hCD8^+$ Т-клеток [31]. Во многих случаях апоптоз является результатом прямой вирусной инфекции или косвенного эффекта иммунной активации. Прямое цитопатическое воздействие ВИЧ обуславливается нарушением метаболических процессов и целостности клеточных мембран $hCD4^+$ Т-лимфоцитов и предшественников, приводящим к апоптозу. Аутофагия отмечается как возможная причина случайной гибели $hCD4^+$ клеток [30, 32]. Другой причиной может быть активность цитотоксических $hCD8^+$ Т-клеток, направленная против нормальных $hCD4^+$ клеток [20, 33]. Снижение количества $hCD4^+$ лимфоцитов периферической крови с течением времени является результатом разрушения КМ, лимфоидной ткани и блокирования процессов регенерации новых клеток, например, в тимусе [30, 34].

Модельные организмы, сохраняющие естественные анатомо-физиологические свойства

Человекообразные приматы

Ранее генетические исследования показали, что группы М и N ВИЧ-1 произошли от вируса иммунодефицита обезьян (ВИО), поражающего шимпанзе (ВИО_ш), а группы О и Р — от ВИО горилл (ВИО_г), циркулирующего в популяции горилл (*Gorilla gorilla* spp.) [2, 35]. При этом ВИО_г произошёл от ВИО_ш в результате произошедшей 100–200 лет назад передачи [36]. Анализ высококонсервативных участков вирусного генома, изменяющихся при пересечении видового барьера человека обезьянными предшественниками ВИЧ-1, выявил в вирусном матричном белке Gag-30 один сайт, кодировавший метионин и переключившийся на аргинин у предполагаемых предков групп М, N и О ВИЧ-1, что впоследствии привело к сохранению аргинина или лизина в большинстве штаммов ВИЧ-1 в качестве основной аминокислоты. При этом вирус с метионином в положении 30 реплицируется в $CD4^+$ Т-клетках шимпанзе более эффективно, чем изогенный вирус с лизином в том же положении, тогда как в клетках человека всё наоборот [37]. Обратимость данного процесса подтверждена экспериментальным инфицированием шимпанзе ВИЧ-1 [38], в результате которого произошла реверсия основного остатка из Gag-30 обратно на метионин [39]. Развивающиеся со временем потеря $CD4^+$ Т-клеток, тяжёлая тромбоцитопения и характерные для СПИДа признаки приводят инфицированных ВИО_ш шимпанзе к летальному исходу [40].

Этические аспекты существенно ограничивают исследования на человекообразных приматах.

Хотя кинетика репликации ВІО_Ш *in vitro* в hCD4⁺ Т-клетках сходна с таковой у ВІЧ, клеточные культуры не отражают в полной мере всех условий репликации и передачи вируса *in vivo* [41].

Нечеловекообразные приматы

Выявлено, что группы А–Н ВІЧ-2 произошли от ВІО сажистых мангабеев (*Cercocebus atys*) после передачи его человеку [2, 35, 42]. При этом сами мангабеи, даже будучи заражёнными ВІО сажистых мангабеев, не имеют склонности к развитию СПИДа [43], демонстрируя свою релевантность в качестве естественной модели патогенеза ВІЧ у «естественных контроллёров», имеющих низкий уровень виремии в связи с отсутствием хронической иммунной активации [44, 45]. В свою очередь, инфицирующий человека ВІЧ-1 не реплицируется у большинства нечеловекообразных приматов (НЧП), поэтому для моделирования ВІЧ-инфекции используются родственные вирусы обезьян с присущими им ограничениями [46].

Ранние *in vivo* исследования патогенеза ВІЧ-инфекции макрофагов проводились посредством инфицирования ВІО зондских свиныхостых макак (*Macaca nemestrina*) [47]. Однако изучение репликации ВІЧ и ВІО в макрофагах на этих этапах исследований было затруднено, поэтому присутствие вирусных нуклеиновых кислот в этих клетках приписывалось фагоцитозу инфицированных Т-клеток и клеточного детрита [48].

Инфицирование ВІО запускает у зондских свиныхостых макак выработку вируса после активации только латентно инфицированных покоящихся CD4⁺ Т-клеток тканей и периферической крови [23]. Несмотря на отсутствие ВІО в периферической крови у 85,7% проходивших АРТ животных, в базальных ганглиях и теменном отделе коры ГМ выявляются латентно инфицированные макрофаги, содержащие способный к репликации *ex vivo* вирус. Однако в этой модели используются вирусы, обладающие тропизмом как к CD4⁺ лимфоцитам, так и к макрофагам, поэтому это исследование может быть напрямую не сопоставимо с исследованиями других фенотипически ограниченных моделей животных или ВІЧ-инфицированных пациентов [22]. Инфицирование химерным ВІЧ родственного вида — северных свиныхостых макак (*Macaca leonina*) — демонстрирует связь более высокой внутриклеточной экспрессии АРОВЕС3 с более низкой репликацией вируса во время острой фазы [49, 50].

In vitro инфицирование клеток макак резусов (*Macaca mulatta*) ВІЧ-1 невозможно отчасти из-за блокирования капсидов ВІЧ-1 клеточным фактором TRIM5а и неспособности Vif связывать и индуцировать деграцию АРОВЕС3. Для обхода этих ограничений в молекулярные клоны ВІЧ-1

включаются последовательности капсида и Vif ВІО макак (ВІО_М). В результате последующего *in vitro* пассирования в клетках человека СЕМх174 химерный вирус приобретает 88% генома ВІЧ-1, в том числе способность к устойчивой репликации и индукции обильных цитопатических эффектов. Таким образом, возникший случайно или в процессе адаптации обход ограничений, связанных с капсидом и Vif, может гарантировать обеспечение межвидовой передачи лентивирусов приматов [46].

Преимущественный тропизм ВІЧ к hCCR5⁺/hCD4⁺ лимфоцитам собственной пластинки слизистой оболочки (СПСО) кишечника [51, 52] положительно коррелирует с данными, полученными от заражённых ВІО_{М251} [53–55], у которых во время острой фазы вирус поражает 30–60% всех CD4⁺ Т-клеток. На 3-и сутки после внутривенного (в/в) инфицирования практически все животные демонстрируют увеличение количества CD4⁺ Т-клеток, достигая пика на 10-е сутки, после чего вначале их количество резко снижается в крови и ЛУ, а несколькими днями позже — в наиболее обогащённой CD4⁺ лимфоцитами СПСО кишечника. Однако исчезнувшие из крови ССR5⁺/CD8⁺ Т-клетки продолжают обнаруживаться в других тканях [56].

Интравагинальная (и/в) инокуляция ВІО приводит к инфицированию шейки матки макак резусов в течение 2 дней. Дальнейшее распространение вируса происходит посредством миграции CD4⁺ и дендритных клеток в регионарные ЛУ, а затем в кровотоки. При этом инфекция распространяется не только среди активированных и пролиферирующих Т-клеток, сходных с короткоживущей популяцией, продуцирующей основную массу вирионов ВІЧ-1 у человека, но и в покоящихся Т-клетках [57].

Для *in vivo* имитации развития нарушений ЦНС на фоне СПИДа макакам резусам, инфицированным ВІО_{М251}, в/в инъецируются антитела против CD8, ускоряя миграцию и депонирование моноцитов и макрофагов в тканях ГМ, что приводит к развитию ВІО-индуцированной энцефалопатии [58]. В свою очередь, предварительное истощение CD4⁺ лимфоцитов рекомбинантными антителами вызывает стойкое инфицирование макрофагов и появление у вируса CD4-независимой оболочки, способствующей проникновению в клетки, экспрессирующие ССR5 при отсутствии CD4 [59].

Этические аспекты, ограничивающие *in vivo* исследования с использованием гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) человека на приматах [60], определили направление дальнейших исследований ВІЧ-инфекции на моделях мелких животных, частично обладающих иммунной системой человека.

В табл. 1 обобщены данные о модельных организмах, сохраняющих естественные анатомофизиологические свойства.

Химерные модельные организмы

Модель *hu-Thy/Liv*

Химерная модель *hu-Thy/Liv/SCID*, получаемая посредством трансплантации эмбриональных тканей тимуса и печени человека под почечную капсулу гомозиготным мышам с тяжёлым комбинированным иммунодефицитом (SCID) *C.B-17^{scid/scid}* [61, 62], обладает редуцированной реакцией «трансплантат против хозяина» (РТПХ) и способна поддерживать функциональность трансплантатов до 15

мес [63]. При этом трансплантированные ткани тимуса демонстрируют морфолого-функциональное подобие тканям нормального тимуса плода человека по составу субпопуляций тимоцитов и их экспрессии *hCXCR4* и *hCCR5* [12].

В отличие от равнозначной кинетики ВИЧ-инфекции в СПИД, наблюдаемой как у носителей R5-изолятов, так и у носителей X4-изолятов, в модели *hu-Thy/Liv/SCID* R5-изоляты проходят двухэтапный цикл заражения, сперва медленно раз-

Таблица 1. Модельные организмы, сохраняющие естественные анатомо-физиологические свойства
Table 1. Models maintaining natural anatomical and physiological features

Модельный организм Model	Способ инфицирования; патоген Method of infection; pathogen	Патофизиологические свойства Pathophysiological features
Шимпанзе Chimpanzee	Естественный; ВИО _ш Natural; SIV of chimpanzee	Истощение CD4 ⁺ Т-клеток, тяжёлая тромбоцитопения и характерные для СПИДа признаки, приводящие к летальному исходу [40] CD4 ⁺ T-cell depletion, severe thrombocytopenia, and signs of AIDS leading to death [40]
Сажистый мангабей Sooty mangabey	В/в; ВИЧ-1 Intravenously (i/v); HIV-1	Лёгкая степень тромбоцитопении и лейкопении [38] Mild thrombocytopenia and leukopenia [38]
Макак резус Rhesus macaque	В/в; инфицированная ВИО сажистых мангабеев гомологичная плазма I/v; SIV of sooty mangabey-infected homologous plasma	Отсутствие хронической иммунной активации, исключающее высокий уровень виремии [44] Absence of chronic immune activation that preclude high levels of viremia [44]
Макак резус Rhesus macaque	В/в; химерный ВИЧ-1 I/v; HIV-1 chimeric strain	Возможность межвидовой передачи между приматами [46] Possibility of interspecific transmission between primates [46]
Северный свинохвостый макак Northern pig-tailed macaque	В/в; ВИО _{M251} I/v; SIV _{mac251}	Поражение 30–60% всех CD4 ⁺ Т-клеток. Практически полная потеря всех CCR5 ⁺ /CD4 ⁺ Т-клеток в СПСО тощей кишки [53–56]. Распространение вируса посредством миграции дендритных и CD4 ⁺ Т-клеток, в том числе покоящихся, в регионарные ЛУ и кровотока [57]. Ускорение миграции и депонирования моноцитов и макрофагов в тканях ГМ стимулируют развитие ВИО-индуцированных нарушений в ЦНС на фоне СПИДа [58]. Стойкое инфицирование макрофагов и появление CD4-независимой оболочки у вируса после предшествующего инфицированию истощения CD4 ⁺ клеток [59] 30–60% of all CD4 ⁺ T cells are affected. Almost complete loss of all CCR5 ⁺ /CD4 ⁺ T cells in the jejunum [53–56]. The spread of the virus through the migration of dendritic and CD4 ⁺ T cells, including dormant ones, into the regional LN and bloodstream [57]. Acceleration of migration and deposition of monocytes and macrophages in brain tissues stimulate the development of SIV-induced disorders in the central nervous system against the background of AIDS [58]. Persistent infection of macrophages and the appearance of CD4-independent envelope in the virus after the previous infection depletion of CD4 ⁺ cells [59]
Северный свинохвостый макак Northern pig-tailed macaque	В/в; инфицированные трансгенным ВИЧ-1 аутологичные мононуклеары периферической крови I/v; HIV-1-infected peripheral blood autologous mononuclear cells	Устойчивая репликация ВИЧ-1 в нецелевом организме [50] Stable replication of HIV-1 in a non-target organism [50]
Зондский свинохвостый макак Sundaland pig-tailed macaque	В/в; тропный к макрофагам ВИО I/v; macrophage-tropic SIV	Репликация вируса после активации только латентно инфицированных покоящихся CD4 ⁺ Т-клеток [23] Virus replication after activation of only latently infected resting CD4 ⁺ T cells [23]
Зондский свинохвостый макак Sundaland pig-tailed macaque	В/в; иммуносупрессорный и нейровирулентный штаммы ВИО I/v; immunosuppressive and neurovirulent SIV	Стойкое инфицирование макрофагов [47] Persistent infection of macrophages [47]
Зондский свинохвостый макак Sundaland pig-tailed macaque	В/в; ВИО I/v; SIV	Сохранение латентно инфицированных макрофагов в базальных ганглиях и теменном отделе коры ГМ при отсутствии ВИО после АРТ [22] Retention of latently infected macrophages in the basal ganglia and parietal cortex in the absence of SIV after antiretroviral therapy [22]

множаясь в медуллярных стромальных клетках, не вызывая явной патологии, а затем инфицируя кортикальные CD4⁺/CD8⁺ тимоциты, впоследствии вызывая их умеренное истощение [6, 12]. Наблюдаемые после 17 дней инфицирования абсолютные уровни репликации Х4-изолятов в кортикальных тимоцитах [6, 12] снижаются после 20 дней инфицирования в результате опосредованного ВИЧ-1 истощения этих тимоцитов, приводя к их практически полному исчезновению в течение последующих 15–20 дней [61]. При этом уровни p24 у мышей, инфицированных Х4-изолятами, в 14 раз выше по сравнению с инфицированными R5-изолятами, что обусловлено влиянием Nef на репликацию и усиление цитопатической составляющей патогенеза Х4-изолятов при инфицировании *in vivo* [64]. В то же время Х4-изоляты способны приобретать R5-подобный фенотип и инфицировать слабо экспрессирующие CCR5 медуллярные стромальные тимоциты, медленно реплицируясь в них, иногда вызывая их истощение [1].

В модели hu-Thy/Liv/SCID инфицирование трансплантированных тимоцитов возможно только отличным от естественных путей передачи возбудителя способом. Отсутствие системной вирусемии препятствует анализу репликации вируса и его влияния на тимоциты, требуя хирургического удаления фрагмента ткани или эвтаназии животного [62]. Этим объясняется потребность в животной модели, способной инфицироваться тем же способом, что и человек, например, через контакт слизистых оболочек, т.к. инфицированные ВИЧ клетки могут передавать вирус как клеткам иммунной системы, так и клеткам слизистых оболочек [65, 66].

КМ мышей hu-Thy/Liv/NOD/SCID/ γ c^{-/-} (NSG), имеющих только Т-клетки (также называемых «Т-cell only mice» или «ТО-мышь»), не продуцирует человеческие миелоидные и В-клетки [67, 68], а благодаря нокауту γ c у данной модели на протяжении 14 мес не проявляются признаки РТПХ. После в/в или внутрибрюшинного инфицирования не реплицирующимся *in vivo* в тканевых макрофагах R5-изолятом, тропным исключительно к Т-клеткам человека, наличие вирусной РНК (вРНК) и клеток p24⁺ отмечается по всему ГМ, включая мозжечок, продолговатый мозг и кору больших полушарий [67]. Поддерживаемые в периферической крови высокие уровни репликации вируса приводят к умеренному снижению популяции hCD4⁺ лимфоцитов, однако ежедневное введение комбинированной АРТ значительно снижает вирусную нагрузку вплоть до неопределяемого в плазме уровня с сохранением латентно инфицированных покоящихся CD4⁺ Т-клеток [68]. Таким образом, модель hu-Thy/Liv/NSG демонстрирует состоятельность Т-клеток в установлении и поддержании продуктивной ВИЧ-инфекции ГМ и отсутствие необходимости в миело-

идных клетках для транспортировки вируса с периферии в ГМ [67].

Модель hu-BLT

Возможность ректального и и/в инфицирования ВИЧ химерных мышей определяется наличием человеческих клеток в ЖРТ и прямой кишке, однако степень восстановления этих клеток зависит непосредственно от линии мышей и протокола гуманизации. Пониженный уровень активности эндогенных естественных клеток-киллеров у мышей NOD/SCID и NSG по сравнению с мышами SCID обеспечивает более длительное и надёжное восстановление клеток врождённого и адаптивного иммунного ответа человека. Кроме того, Т-клетки этих мышей, как и у человека, демонстрируют весьма разнообразный репертуар V β Т-клеточных рецепторов [17]. Гуманизация этих мышей происходит схожим с моделью hu-Thy/Liv способом: после трансплантации под капсулу почки сэндвич-трансплантата тимус–печень–тимус из эмбриональных тканей человека и его приживления производится введение фетальных CD34⁺ ГСК. Модель получила название «bone marrow–liver–thymus» (BLT). У мышей hu-BLT/NOD/SCID трансплантированная ткань тимуса развивается в схожий с тимусом человека тимический органоид, в котором клетки-предшественники человеческих Т-лимфоцитов, ограниченные лейкоцитарным антигеном человека (HLA), могут мигрировать и развиваться в полностью функциональные периферические Т-клетки в контексте аутологичного эпителия тимуса человека [69].

Анализ тканевого распределения популяций иммунных клеток человека у мышей hu-BLT/NOD/SCID выявил соответствующее распределение лимфоидных и миелоидных клеток человека в КМ, селезёнке, ЛУ, печени, лёгких и ЖКТ [17]. В слизистой оболочке влагалища, эктоцервикса, эндцервикса, матки и кишечника отмечается интенсивное восстановление hCD4⁺ Т-клеток, моноцитов/макрофагов и дендритных клеток. Т-клетки располагаются непосредственно внутри эпителиального слоя в виде локализованной на границе эпителия и СПСО полосы вдоль базальной мембраны и по всей собственной пластинке, а макрофаги и дендритные клетки — в собственной пластинке на протяжении всего ЖРТ мышей [69]. Данные морфологические особенности чётко коррелируют с локализацией Т-клеток у человека, наделая модель hu-BLT/NOD/SCID восприимчивостью к эффективной вагинальной передаче R5-изолятов [69, 70] и ректальной передаче Х4- и R5-изолятов [71, 72].

Атравматическая и/в инокуляция однократной бесклеточной дозы первичного R5-изолята ВИЧ-1 мышам hu-BLT/NOD/SCID приводит к установлению системной инфекции у 88% мышей, выражающейся в появлении в плазме антигена p24 и/или

вРНК через 2 нед, а также в прогрессирующем снижении популяции $hCD4^+$ Т-клеток в периферической крови, напоминая острую фазу инфекции ВИЧ-1 у человека. Диссеминированная инфекция отмечается на протяжении всего ЖКТ: инфицированные клетки обнаруживаются в СПСО и эпителии тонкой кишки, приводя к резкой потере тканевых $hCD4^+$ лимфоцитов и эффекторных клеток памяти [69].

Большинство $hCD4^+$ Т-клеток, присутствующих в ЖКТ мышей hu-BLT/NOD/SCID и hu-BLT/NSG, одновременно экспрессируют CCR7 и CCR5, являясь потенциальными клетками-мишенями ВИЧ, аналогично с тканью шейки матки человека. Поскольку стромальные клетки являются основным источником CCL19 и CCL21, мышечных лигандов CCR7, гуманизированные мыши экспрессируют их на более высоких уровнях, чем человеческие лиганды в цервик-вагинальном тракте и подвздошных ЛУ. Через 6–10 сут после инфицирования количество $p24^+$ Т-клеток $hCD4^+$ в цервик-вагинальном тракте становится больше, чем в цервикальных ЛУ, а через 14 сут инфицированные клетки и вРНК обнаруживаются в кишечнике, плазме и селезёнке, а в мезентериальных ЛУ — ещё и вДНК. Такая кинетика процессов демонстрирует отсутствие критического значения CCR7-зависимой миграции лейкоцитов для распространения ВИЧ [73].

Наличие у человека структур, подобных ассоциированной с кишечником лимфоидной ткани (АКЛТ), подняло вопрос о возможности мышечных криптопатчей инициировать генез АКЛТ человека. Передача сигналов IL-7R необходима для генеза АКЛТ, поэтому нормального развития АКЛТ не происходит у мышей с нарушенной передачей сигналов IL-7R, включая мышей NSG, у которых отсутствует общая γ -цепь. Поэтому исследования ректальной передачи ВИЧ-1 проводятся на обладающих криптопатчами мышцах hu-BLT/NOD/SCID, точно воспроизводящих истощение $hCD4^+$ Т-клеток в структурах АКЛТ. Восстановление $hCD4^+$ и $hCD8^+$ Т-клеток, миелоидных клеток и единичных наивных Т-клеток по всему эпителию и СПСО тонкого и толстого отделов кишечника делает модель hu-BLT/NOD/SCID восприимчивой к ректальной передаче ВИЧ-1 [17]. Помимо этого, у мышей hu-BLT/NOD/SCID плазматические клетки, секретирующие hIgA, преобладают над секретирующими hIgG, что положительно коррелирует с секрецией IgA СПСО кишечника у человека. В свою очередь, в кишечнике мышей hu-BLT/NSG присутствует небольшое количество плазматических клеток, обладающих высоким уровнем секреции hIgA и hIgG [74].

Ректальное инфицирование приводит к значительному увеличению количества перфорин-позитивных клеток в структурах АКЛТ мышей hu-BLT/NOD/SCID, появлению клеток $p24^+$ и снижению количества $hCD4^+$ лимфоцитов $hCD4^+$ по всему

ЖКТ [17], что согласуется с истощением $hCD4^+$ Т-клеток в СПСО кишечника и внутриэпителиальных отделах при ВИЧ-инфекции у человека. При этом различий в уровнях $hCD8^+$ Т-клеток у ВИЧ-позитивных и ВИЧ-негативных животных не наблюдается [74]. Присутствующая у мышей hu-BLT/NOD/SCID строма тимуса человека позволяет образовывать тимоциты человека в полном контексте главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) человека, делая эту модель весьма актуальной для оценки специфических иммунных реакций на потенциальные вакцины против ВИЧ [75].

К сожалению, адаптивный перенос активированных $V\delta 2$ -клеток, демонстрирующий относительную терапевтическую эффективность при лечении некоторых инфекционных заболеваний, не способствует контролю ВИЧ-инфекции у мышей hu-BLT/NSG, наоборот, усугубляя вируемию, что свидетельствует о возможной роли $V\delta 2$ -клеток в содействии распространению вируса в качестве ранних мишеней ВИЧ [76].

Экспрессирующие как hCCR5, так и hCXCR4 интерстициальные $hCD4^+$ лимфоциты лёгких [77], в отличие от $hCD4^+$ лимфоцитов альвеолярного пространства или циркулирующей крови, сильно истощаются на ранних стадиях инфекции ВИЧ-1 *ex vivo* в лёгочной ткани человека и *in vivo* у мышей hu-BLT/NOD/SCID и hu-BLT/NSG, демонстрируя наивысшие показатели их инфицирования [78]. Инфицированные и/в R5-изолятом мыши hu-BLT/NOD/SCID и hu-BLT/NSG предоставляют возможность наблюдать *in vivo* истощение $hCD4^+$ Т-клеток интерстициальной лёгочной ткани [73] на стадиях, отражающих острую и раннюю хроническую инфекцию ВИЧ-1 [79, 80]. Вирусная нагрузка в общей лёгочной ткани и отсортированных $hCD4^+$ Т-клетках лёгочной ткани, а также соотношение клеток $p24^+/hCD4^+$ оказались выше по сравнению с тканями селезёнки, в то время как количество $hCD4^+$ Т-клеток в интерстиции лёгких и бронхоальвеолярном лаваже снижались на протяжении 7 нед. Общее количество $hCD4^+$ и $hCD8^+$ Т-клеток коррелирует с таковым в бронхоальвеолярном лаваже, но не в интерстиции лёгких, предполагаемая рекрутирование Т-лимфоцитов в альвеолярное пространство. Таким образом, раннее и тяжёлое истощение $hCD4^+$ Т-клеток лёгких у этих моделей аналогично наблюдаемому в кишечнике [78].

Происхождение микроглии из ранних клеточных-предшественников, образующихся в желточном мешке, вызывало сомнения в возможности воспроизведения микроглиальных клеток человека современными моделями гуманизированных мышей [67]. Однако мышечные модели hu-BLT/NSG и hu-BLT/IL34-Tg/NOG демонстрируют эффективное восстановление микроглии человека и способность поддержания репликации ВИЧ в ГМ [67, 81].

Мыши NSG, обладая гиперчувствительностью к ионизирующему излучению, демонстрируют более низкое общее количество ГСК, миелоидных и В-клеток человека в ГМ после прекондиционного облучения повышенными дозами. Помимо этого, в ГМ самок мышей hu-BLT/NSG восстанавливается большее количество человеческих В-клеток, чем у самцов, в то время как количество Т-клеток и соотношение $hCD4^+/hCD8^+$ не зависит от пола или дозы облучения. Присутствие клеток-мишеней ВИЧ во всем ГМ мышей hu-BLT/NSG подтверждено миграцией ГСК $hCD45^+$, $hCD3^+$ Т-клеток и $hCD68^+$ макрофагов из обонятельной луковицы через основание ствола мозга в продолговатый мозг. Подмножества $hCD4^+$ и $hCD8^+$ лимфоцитов присутствуют во всем ГМ, включая обонятельную луковицу, кору, хвостатое ядро, таламус, средний мозг, понс и мозжечок, при этом в последнем содержится значительно большее количество $hCD68^+$ макрофагов, чем в остальных отделах ГМ. Инфицирование мышей hu-BLT/NSG R5- и X4-изолятами через слизистую оболочку и парентерально приводит к обнаружению ассоциированных с клетками вДНК и вРНК в 85,1 и 92,9% ГМ соответственно, независимо от способа инфицирования. По мере продолжительности инфекции увеличение количества вДНК в ГМ влечёт быстрое и устойчивое снижение как общего количества человеческих Т-клеток, так и $hCD4^+$ Т-клеток, а также соотношения $hCD4^+/hCD8^+$ в ГМ, напоминающее потерю $hCD4^+$ Т-клеток в тканях слизистых оболочек ЖРТ и ЖКТ на ранних стадиях инфекции. Клетки $p24^+$ обнаруживаются в коре ГМ, мозжечке, таламусе, продолговатом и среднем мозге. Отмечается прямая зависимость между уровнями клеточно-ассоциированной вРНК в ГМ и вирусной нагрузкой плазмы, а также между продолжительностью инфекции и количеством миелоидных клеток [67]. Кроме того, значимость атипичных подмножеств клеток в персистенции ВИЧ продемонстрирована реактивацией персистирующего вируса в периваскулярных макрофагах, астроцитах и микроглии ГМ инфицированных мышей [82].

В то время как у мышей hu-BLT/NSG человеческие Т-клетки развиваются в эпителии тимуса человека и ограничены ГКГ человека [70, 83], у мышей hu-BLT/NOD-Rag2^{-/-}γс^{-/-} (NRG) человеческие Т-клетки образуются в тимусе в контексте ГКГ мыши [84–86]. Инфицирование ВИЧ-1 аналогично индуцирует у этой модели активацию и истощение Т-клеток [87–89].

Гуманизация в рамках модели BLT мышей ТКО, обладающих нокаутом генов *Rag2*, *Il2rg* и *CD47*, сопровождается устойчивым восстановлением в КМ, селезёнке и мезентериальных ЛУ всех основных подмножеств клеток, включая $hCD4^+$ и $hCD8^+$ Т-лимфоциты, $hCD19^+$ В-клетки, $hCD14^+$ моноциты, миелоидные и плазмоцитоидные дендрит-

ные клетки. Кроме того, организованные в фолликулы участки белой пульпы селезёнки восстанавливаются обладающими преимущественно зрелыми $hCD3^+$ Т-клетками и $hCD20^+$ В-клетками, а в АКЛТ толстого и тонкого отделов кишечника — подмножествами активированных $hCD4^+$ и $hCD8^+$ лимфоцитов, а также миелоидными и плазмоцитоидными дендритными клетками. Ректальное и внутрибрюшинное [90] инфицирование мышей hu-BLT/TKO R5-изолятом ВИЧ-1 индуцирует появление специфичных к gp120 антител, а также снижение количества $hCD4^+$ Т-клеток при сопутствующем увеличении количества активированных $hCD8^+$ Т-клеток. Таким образом, модель hu-BLT/TKO демонстрирует классические иммунологические признаки острой инфекции ВИЧ-1 человека [91].

В зависимости от используемой линии мышей модели hu-BLT способны восстанавливать функциональную иммунную систему человека [92, 93] и инфицироваться ВИЧ-1 схожими с человеком способами [94], возводя эту модель в ранг «золотого стандарта» для *in vivo* исследований ВИЧ-1 [95, 96].

Модель hu-HSC

Модели, основанные на лишённых фона NOD («non-obese diabetic», не страдающий ожирением диабетик) мышах Rag1^{-/-}Il2rg^{-/-} и Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-} (обладающие нокаутом двух генов, DKO), которым трансплантируются ГСК человека $hCD34^+$, демонстрируют восприимчивость к заражению R5- и X4-изолятами ВИЧ-1 через слизистую оболочку, приводящему к хроническому инфицированию [97, 98].

Трансплантация клеток КМ или пуповинной крови $hCD34^+$ мышам NSG приводит к успешной дифференцировке различных популяций клеток, включая человеческие Т- и В-клетки, а также естественные клетки-киллеры, моноциты/макрофаги, и дендритные клетки. Помимо этого, $hCD4^+$ Т-клетки этой модели очень чувствительны к R5- и X4-изолятам, индуцирующим интенсивную вирусную нагрузку в плазме [99–101], продолжающуюся более 40 дней [101].

Для создания модели, обладающей последовательным восстановлением и развитием ЛУ, устраняющими недостатки формирования вторичной лимфоидной ткани, изменениям подверглись мыши с фоном BRG. Модель hu-HSC/BRGST, созданная на основе мышей Balb/c Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}Sirpa^{NOD} (BRGS), экспрессирующая не зависящий от *IL2rg* сходный по структуре и функции с *IL7* трансгенный лимфопоэтин стромальных тимоцитов, обладает устойчивыми клеточными и гуморальными реакциями человека за счёт стимуляции В- и Т-клеточных реакций [102]. Таким образом, мыши hu-HSC/BRGST демонстрируют усиленное переключение классов изотипов иммуноглобулинов, развитие Т-клеток центральной и эффекторной памяти и

фолликулярных Т-хелперов во вторичных лимфоидных тканях с выраженными В-клеточными зонами [103].

Одной из вариаций модели hu-HSC являются полностью лишённые Т-клеток человека гуманизированные мыши («myeloid-only», Мо-мыши), характеризующиеся стабильным уровнем виремии, сопровождающейся увеличением количества макрофагов человека в ГМ. Репликация тропных к макрофагам R5-изолятов ВИЧ-1 и ВИЧ-2 происходит только в восстановленных макрофагах и миелоидных клетках в течение 15 нед. В свою очередь, репликации тропных к Т-клеткам R5-изолятов ВИЧ-1 или ВИЧ-2 не происходит вследствие отсутствия Т-клеток. У инфицированных мышей hu-Mo/NOD/SCID hCD68⁺ макрофаги и клетки p24⁺ обнаруживаются по всему ГМ, включая мозжечок, путамен, кору, вентральное полосатое тело и ствол ГМ [104]. В этой модели длительное поддержание инфекции тканевыми макрофагами в отсутствие Т-клеток подразумевает их уязвимость в качестве истинных мишеней и скрытых резервуаров ВИЧ-инфекции у человека. Кроме того, эти мыши способны к *de novo* передаче возбудителя, который также эффективно реплицируется в организме нового хозяина в присутствии или в отсутствие Т-клеток человека [104].

Результаты, полученные на модели hu-Thy/HSC/NRG, созданной путём трансплантации фрагмента фетального тимуса под капсулу почки и в/в введения ГСК человека сублетально облучённым мышам NRG, демонстрируют схожие с мышами hu-HSC/NRG результаты активации, потери функциональности и истощения Т-клеток после инфицирования ВИЧ-1, а также схожий уровень экспрессии CD38 и HLA на hCD8⁺ лимфоцитах. При этом соотношение Т-клеток hCD4⁺/hCD8⁺ у этих мышей незначительно выше, в то время как процентное содержание человеческих естественных клеток-киллеров, плазматоцитозных дендритных клеток и моноцитов ниже, чем у мышей hu-HSC/NRG. Кроме того, мыши hu-Thy/HSC/NRG способны экспрессировать *PD-1* — маркер утраты функциональности Т-клеток [105].

Несмотря на отсутствие зрелых В-клеток с возможностью переключения изотипа [106], результативное инфицирование слизистой оболочки ЖКТ у мышей hu-HSC/NRG наилучшим образом моделирует контактный способ передачи ВИЧ-1 и позволяет изучать изменения микробиоты [107], местную предконтактную профилактику [108, 109] и вакцинацию [106].

Модель hu-PBMC

Модель hu-PBMC является наиболее простой с точки зрения технического исполнения, но разнообразность трансплантируемых клеточных популяций повышает риск раннего развития РТПХ и тре-

бует использования животных с высокой степенью иммунодефицита. Восстановленные hCD45⁺ клетки обнаруживаются в периферической крови, ЛУ, селезёнке и печени мышей примерно через 4 нед после внутривенной инъекции мононуклеаров периферической крови человека мышам NSG, в то время как клетки hCD19⁺ детектируются только в ЛУ и селезёнке. hCD3⁺ Т-клетки наблюдаются в ЛУ, селезёнке и печени, в то время как субпопуляции hCD4⁺ и hCD8⁺ имеют обширную локализацию. Большинство hCD3⁺ Т-клеток красной пульпы являются hCD8⁺ Т-клетками, тогда как в белой пульпе обнаруживаются в основном hCD4⁺ Т-клетки. hCD8⁺ лимфоциты также детектируются вокруг перипортальных областей печени, в то время как hCD4⁺ Т-клетки распределяются по тканям более диффузно. hCD4⁺ и hCD8⁺ Т-клетки активно восстанавливаются в ЛУ, содержащих единичные Т-клетки мыши. При этом нормальное соотношение hCD4⁺/hCD8⁺, отмечаемое у донора, у мышей-реципиентов оказалось повышено в 2 раза, сохраняясь на этом уровне в течение 10 нед. Внутривенное инфицирование обладающим двойной тропностью штаммом HIV-1_{DN12} привело к истощению hCD4⁺ Т-клеток в периферической крови спустя 3 нед после заражения, а ещё через 2 нед произошло их полное исчезновение. У мышей, инфицированных X4-изолятом, истощение hCD4⁺ Т-клеток наблюдается через 4 нед после заражения, демонстрируя зависимость кинетики истощения hCD4⁺ лимфоцитов от тропности инфицирующего агента [110].

Несмотря на то что мыши NSG не обладают зрелыми эндогенными Т- и В-клетками и естественными клетками-киллерами, у модели hu-PBMC/NSG в течение 4–16 нед после гуманизации проявляются признаки РТПХ [110, 111]. По этой же причине использование этой модели противоречит политике в области проведения исследований на животных многих исследовательских организаций [112].

Наиболее подходящими животными для создания модели hu-PBMC считаются мыши ТКО [112], т.к. нокаут *CD47* обеспечивает им толерантность к трансплантированным клеткам человека, отдаляя развитие РТПХ и потерю массы тела в среднем на 24 дня по сравнению с моделью hu-PBMC/NSG [112]. Мыши hu-PBMC/TKO демонстрируют способность к обширной репопуляции многих тканей и органов клетками hCD3⁺, hCD4⁺ и hCD8⁺, включая селезёнку, мезентериальные ЛУ, КМ, печень, толстый отдел кишечника, прямую кишку и ГМ, в то время как hCD14⁺/hCD163⁺ макрофаги и hCD20⁺ В-клетки восстанавливаются в ЛУ и селезёнке. Внутривенное инфицирование R5-изолятом через 2 нед приводит к устойчивой виремии, сопровождаемой снижением количества hCD4⁺ лимфоцитов, причём при увеличении вирусной нагрузки в плазме крови количество циркулирующих hCD4⁺ Т-клеток

пропорционально снижается, достоверно моделируя инфекцию ВИЧ-1 у человека. Ректальный и и/в способы заражения демонстрируют аналогичные результаты, хотя и с некоторой отсрочкой развития признаков инфицирования. Антиген р24 обнаруживается в мезентериальных ЛУ, КМ, селезёнке и прямой кишке, однако, несмотря на способность этой модели восстанавливать hCD4⁺ Т-клетки в ГМ, результаты индикации р24 в нем неубедительны [112]. Благодаря не требующей специальных навыков технике гуманизации и достаточно безопасным для оператора способам инфицирования животных эта новая модель имеет большие шансы завоевать признание научного сообщества.

Трансгенные животные

Помимо того, что ресурсы тканевого материала человека для создания гуманизированных мышей достаточно ограничены, а сама процедура трансплантации для успешного приживания требует серьёзных технических навыков персонала, отсутствие возможности проведения оценки патогенеза СПИДа требует дополнительных животных моделей. Как оказалось, наблюдаемые при некоторых *in vitro* исследованиях активация клеточных сигнальных путей, подавление ГКГ мыши, повышение патогенности вирусных частиц и Nef-опосредованное усиление вирусной репликации и патогенеза путём подавления hCD4 не являются ведущими особенностями для фенотипа Nef *in vivo* [113]. Так, у мышей, экспрессирующих полный геном ВИЧ-1, содержащий модифицированный длинный терминальный повтор, и мышей, способных к экспрессии Nef, Gag или протеазы в волокнах хрусталика, развиваются истощение и поражения глаз. Экспрессия половины генома ВИЧ-1 3' вызывает у мышей тяжёлую нефропатию, а экспрессия Nef или Tat — гиперплазию эпидермиса. В свою очередь, мышам, Т-клетки которых экспрессируют CD4⁺, и мышам CD4C/HIV^{WT} Tg, обладающим экспрессирующими полным геном ВИЧ-1 клетками, свойственна низкая жизнеспособность вследствие снижения моноцитарно-макрофагально-лимфоцитарных клеточных популяций при наличии сопутствующих поражений почек и лёгких, фенотипически близких к таковым при СПИДе у человека [114]. Сходство этой модели с проявлениями СПИДа у детей предполагает решающую роль Nef в прогрессировании СПИДа у человека, независимо от его роли в репликации вируса [115]. Экспрессия белка Tat в ЦНС мышей GT-tg позволяет оценивать поведенческие расстройства, связанные с действием Tat ВИЧ-1 [116].

Некоторые модели, экспрессирующие миелинные цитокины hSCF, hGM-CSF и hIL-3 (мыши NSGS) [117, 118], а также модели MITRG и MISTR [119] оказались нежизнеспособными, демон-

стрируя короткую продолжительность жизни — 10–20 нед после гуманизации.

Наконец, сообщается о создании трансгенных кроликов, несущих входной рецепторный комплекс ВИЧ-1 hCD4/hCCR5, путём совместной микроинъекции обеих конструкций. Разработчики этой модели планируют использовать первичные клеточные культуры, полученные от этих животных, для адаптации ВИЧ, что, несомненно, повлечёт изменение самого вируса [23].

В табл. 2 обобщены данные о химерных модельных организмах.

Заключение

ВИО только на 50% схож с ВИЧ, и существуют значительные различия в составе подмножества γδ-лимфоцитов в фенотипе у обезьян и людей [76], однако модели ВИО-инфицированных НЧП служат основной животной моделью для *in vivo* оценки эффективности потенциальных вакцин и микробицидов [120, 121]. Несмотря на то что эпитопы в вакцинах должны быть сопоставлены с вирусом-индуктором инфекции, ВИО макак резусов длительное время оставался объектом, наиболее часто используемым для доклинической оценки вакцин против ВИЧ [75].

Использование гуманизированных мышей в исследованиях АРТ обязывает к подготовке и представлению вирусных эпитопов в контексте ГКГ человека, а не мыши. В частности, иммунодоминантные эпитопы, отображаемые на ГКГ мыши к Т-клеточным рецепторам человека, могут не иметь прямого отношения к отображаемым на ГКГ иммунодоминантным эпитопам, и тем более Т-клеточным рецепторам человека, поэтому особенно важно полностью исследовать процесс образования Т-клеток у гуманизированных мышей в отсутствие строения человека [75].

По сравнению с мышами hu-HSC/NSG, hu-/Thy/Liv/NSG и hu-HSC/NRG мыши hu-BLT/NSG обладают лучшим восстановлением функциональной иммунной системы человека, включая локализованную в слизистых оболочках [92, 93], и способны к инфицированию ВИЧ-1 интравагинальным, ректальным и оральным путями [94]. По этой причине hu-BLT по настоящее время считаются «золотым стандартом» для исследований ВИЧ-1 на мышинных моделях [95, 96].

Переход тропных к Т-клеткам ЦНС вирусов к фенотипу, тропному к макрофагам, в организме человека обычно происходит в результате интенсивного размножения и продолжительного инфицирования, приводящим к эволюции вируса. Однако продолжительность жизни мышей коротка относительно продолжительности жизни людей, поэтому возможность наблюдения за животными моделями в течение нескольких лет после заражения исклю-

Таблица 2. Химерные модельные организмы

Table 2. Chimeric models

Мышиная модель Mouse model	Способ инфицирования; патоген Method of infection; pathogen	Анатомо-физиологические свойства Anatomical and physiological features	Патофизиологические свойства Pathophysiological features
hu-Thy/Liv/SCID	Инокуляция ВИЧ-1 в ткань трансплантата HIV-1 inoculation into graft tissue	Состав субпопуляций тимоцитов трансплантата и экспрессия hCXCR4 и hCCR5 подобны тканям нормального тимуса плода человека, их функциональность сохраняется в течение 6–15 мес [6, 12, 61–63] Grafts' thymocytes subpopulations composition and hCXCR4 and hCCR5 expression are similar to the normal human fetal thymus tissues, the functionality is kept for 6 to 15 months [6, 12, 61–63]	ГКГ-ограниченное инфицирование и истощение Т-клеток, вплоть до их полного исчезновения [6, 12, 61–63] MHC-limited T cells infection and depletion, up to their complete disappearance [6, 12, 61–63]
hu-Thy/Liv/NSG	В/в и внутрибрюшинно; тропный к Т-клеткам R5-изолят ВИЧ-1 I/v and intraperitoneally; T-cell-tropic R5 HIV-1 isolate	Системное восстановление Т-клеток человека [68] System reconstitution of human T-cells [68]	Продуктивное инфицирование всех отделов ГМ. Миелоидные клетки не требуются для транспортировки ВИЧ с периферии в ГМ [67]. Поддержание высоких уровней репликации вируса в периферической крови, приводящее к умеренному снижению популяции hCD4 ⁺ Т-клеток. Введение комбинированной АРТ приводит к значительному подавлению репликации вируса вплоть до неопределяемого в плазме с сохранением латентно инфицированных покоящихся hCD4 ⁺ Т-клеток [68] Productive infection of all brain divisions. Myeloid cells are not required to transport HIV from the periphery to the brain [67]. Maintaining high levels of virus replication in peripheral blood, leading to a moderate decrease in the hCD4 ⁺ T cell population. Administration of combined antiretroviral therapy leads to a significant suppression of virus replication up to undetectable in plasma with the preservation of latently infected resting hCD4 ⁺ T cells [68]
hu-BLT/NOD/SCID	И/в [17, 69] или ректально [70, 71, 74]; ВИЧ-1 Intravaginally (i/vag) [17, 69] or rectally [70, 71, 74]; HIV-1	Ограниченные HLA интенсивное восстановление, соответствующие распределение и функциональность лимфоидных и миелоидных клеток человека в тканях тимического органа [69], КМ, селезёнки, ЛУ, печени, лёгких, ЖРТ [17, 69], ЖКТ [17, 70, 71, 74] в полном контексте ГКГ человека [65]. Т-клетки демонстрируют разнообразный репертуар рецепторов Vβ Т-клеточных рецепторов [17, 69]. Преобладание секретирующих hlgA плазматических клеток над секретирующими hlgG [74] HLA-limited intensive reconstitution, corresponding distribution and functionality of human lymphoid and myeloid cells in the tissues of the thymic organoid [69], BM, spleen, LN, liver, lungs, FRT [17, 69], gastrointestinal tract [17, 70, 71, 74] and thymic organoid [69] in the context of human MHC [65]. T cells demonstrate a diverse repertoire of Vβ TCR receptors [17, 69]. The predominance of hlgA-secreting plasma cells over hlgM-secreting cells [74]	Системное инфицирование и прогрессирующее истощение hCD4 ⁺ Т-клеток [17, 71], в том числе в интерстициальной лёгочной ткани [74]. Значительно увеличено количество перфорин-позитивных клеток человека [74] System infection and progressive depletion of hCD4 ⁺ T cells [17, 71] including interstitial lung tissue [74]. The number of human perforin-positive cells was significantly increased [74]
hu-BLT/NSG	В/в [76, 88, 89, 104], и/в, ректально или орально [94]; ВИЧ-1	Невозможен генез АКЛТ [74]. ГСК hCD34 ⁺ дифференцируются до зрелых форм, способных к инфицированию ВИЧ [76].	Активация и истощение hCD4 ⁺ Т-клеток [74, 88, 89]. Поддержание репликации ВИЧ в макрофагах hCD68 ⁺ ГМ [67, 104], независимо от способа инфицирования [67].

Продолжение табл. 2 | Continuation of the Table 2

Мышиная модель Mouse model	Способ инфицирования; патоген Method of infection; pathogen	Анатомо-физиологические свойства Anatomical and physiological features	Патофизиологические свойства Pathophysiological features
	i/v [76, 88, 89, 104], i/vag, rectally or orally [94]; HIV-1	<p>Эффективное восстановление микроглии человека за счёт миграции hCD45⁺ клеток, hCD3⁺ Т-клеток и hCD68⁺ макрофагов из обонятельной луковицы через основание ствола мозга в продолговатый мозг [67].</p> <p>В ГМ самок присутствует большее количество человеческих В-клеток, чем у самцов [67].</p> <p>Присутствие hCD4⁺ и hCD8⁺ Т-клеток во всём ГМ, при этом в мозжечке содержится значительно большее количество hCD68⁺ клеток, чем в самом ГМ. Небольшое количество обладающих высоким уровнем секреции hlgA и hlgG плазмоцитов [74].</p> <p>The genesis of GALT is impossible [74]. hCD34⁺ HSCs differentiate to mature forms capable of HIV infection [76].</p> <p>Effective reconstitution of human microglia due to migration of hCD45⁺ cells, hCD3⁺ T cells and hCD68⁺ macrophages from the olfactory bulb through the base of the brainstem to the medulla oblongata [67].</p> <p>There are a large number of human B cells in the brain of females than in males [67].</p> <p>The presence of hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells in the entire brain, while the cerebellum contains a significantly larger number of hCD68⁺ cells than in the brain. A small number of plasmocytes with a high level of hlgA and hlgG secretion [74]</p>	<p>Прямая зависимость между вирусной нагрузкой в плазме и уровнями клеточно-ассоциированной вРНК в ГМ и между количеством миелоидных клеток и продолжительностью инфекции [67].</p> <p>Адоптивно перенесённые активированные клетки Vδ2 содействуют распространению вируса в качестве ранних мишеней ВИЧ [76].</p> <p>Activation and depletion of hCD4⁺ T cells [74, 88, 89].</p> <p>Maintenance of HIV replication in bone marrow hCD68⁺ macrophages [67, 104], regardless of the method of infection [67].</p> <p>There is a direct relationship between the viral load in plasma and the levels of cell-associated RNA in the brain, and between the number of myeloid cells and the duration of infection [67].</p> <p>Adoptively transferred activated Vδ2 cells promote the spread of the virus as early HIV targets [76]</p>
hu-BLT/NRG	В/в; ВИЧ-1 I/v; HIV-1	<p>Восстановление всех основных подгрупп hCD45⁺ лейкоцитов, в том числе в тимусе, в контексте ГКГ мыши [84–86, 105].</p> <p>Reconstitution of all major leukocyte subgroups hCD45⁺, including in the thymus in the context of mouse MHC [84–86, 105]</p>	<p>Активация и истощение Т-клеток [87–89].</p> <p>Персистирующая инфекция ВИЧ-1 приводит к устойчивой и системной индукции IFN-I [87].</p> <p>Activation and depletion of T cells [87–89].</p> <p>Persistent HIV-1 infection leads to stable and systemic induction of IFN-I [87]</p>
hu-HSC/DKO	И/в; ВИЧ-1 I/vag; HIV-1	<p>Восстановление Т-, В-, миелоидных клеток и естественных клеток-киллеров в центральных и периферических лимфоидных органах [97, 98].</p> <p>Reconstitution of T-, B-, myeloid cells and natural killers in central and peripheral lymphoid organs [97, 98]</p>	<p>Восприимчивость к передаче вируса через слизистую оболочку. Истощение hCD4⁺ Т-клеток [97, 98].</p> <p>Susceptibility to mucosal viral transmission. hCD4⁺ T-cells depletion [97, 98]</p>
hu-HSC/NRG	В/в; ВИЧ-1 I/v; HIV-1	<p>Восстановление гемопоэза человека, включая Т-, В-, миелоидные и плазмоцитодендритные клетки, естественные клетки-киллеры и ГСК [84, 86]. Процент приживления hCD45⁺ клеток в КМ в 6 раз выше, чем у мышей NOD/SCID [86].</p> <p>Human hemopoiesis reconstitution, including T-, B-, myeloid and plasmocytoid dendritic cells, natural killers and HSCs [84, 86]. The percentage of hCD45⁺ cells engraftment in the bone marrow is 6-fold higher than in NOD/SCID mice [86]</p>	<p>Истощение, активация и изнурение Т-клеток [87–89]. Экспрессия маркера истощения Т-клеток PD-1 [105].</p> <p>Depletion, activation and exhaustion of T cells [87–89]. Expression of the PD-1 T-cell depletion marker [105]</p>
hu-HSC/NRG	И/в; ВИЧ-1 I/vag; HIV-1	<p>Human hemopoiesis reconstitution, including T-, B-, myeloid and plasmocytoid dendritic cells, natural killers and HSCs [84, 86]. The percentage of hCD45⁺ cells engraftment in the bone marrow is 6-fold higher than in NOD/SCID mice [86]</p>	<p>Системное инфицирование и прогрессирующее истощение hCD4⁺ Т-клеток в ЖКТ и ЖРТ [107].</p> <p>System infection and progressive depletion of hCD4⁺ T-cells in the gastrointestinal tract and FRT [107]</p>
hu-Thy/HSC/NRG	В/в; ВИЧ-1 I/v; HIV-1	<p>Соотношение hCD4⁺/hCD8⁺ Т-клеток, незначительно выше, а процентное содержание естественных клеток-киллеров, плазмоцитодендритных клеток и моноцитов — ниже по сравнению с hu-HSC/NRG [86, 105].</p>	<p>Истощение, активация и изнурение Т-клеток, экспрессия CD38 и HLA на Т-клетках hCD8, экспрессия маркера истощения Т-клеток PD-1 [105].</p> <p>Depletion, activation and exhaustion of T cells, CD38 and HLA expression on hCD8 T cells,</p>

Продолжение табл. 2 | Continuation of the Table 2

Мышиная модель Mouse model	Способ инфицирования; патоген Method of infection; pathogen	Анатомо-физиологические свойства Anatomical and physiological features	Патофизиологические свойства Pathophysiological features
hu-Mo/NOD/SCID	В/в; тропные к макрофагам R5-изоляты ВИЧ-1 и ВИЧ-2 [104] I/v; macrophage-tropic R5 HIV-1 and HIV-2 isolates [104]	The ratio of hCD4 ⁺ /hCD8 ⁺ T cells is slightly higher, and the percentage of natural killer cells, plasmacytoid dendritic cells and monocytes is lower compared to hu-HSC/NRG mice [86, 105] Восстановление hCD68 ⁺ макрофагов по всему ГМ [104] Reconstitution of hCD68 ⁺ macrophages throughout the brain [104]	expression of PD-1 T cell depletion marker [105] Репликация ВИЧ происходит только в миелоидных клетках и hCD68 ⁺ макрофагах, увеличивая количество последних. Отсутствие существенного снижения уровня вiremии после достижения пика. Возможность передачи инфекции <i>de novo</i> и эффективная репликация в организме нового хозяина в присутствии или при полном отсутствии Т-клеток человека [104] HIV replication occurs only in myeloid cells and hCD68 ⁺ macrophages, increasing the number of the latter. The absence of a significant decrease in the level of viremia after reaching the peak. The possibility of <i>de novo</i> transmission of infection and effective replication in the new host in the presence or complete absence of human T-cells [104]
hu-PBMC/NSG	В/в; ВИЧ-1 _{DH 12} I/v; HIV-1 _{DH 12}	Восстановление hCD45 ⁺ клеток в периферической крови, ЛУ, селезёнке и печени. Клетки hCD19 ⁺ детектируются только в ЛУ и селезёнке. Т-клетки активно восстанавливаются в ЛУ, содержащих единичные Т-клетки мыши [110] Recovery of hCD45 ⁺ cells in peripheral blood, lymph nodes, spleen and liver. hCD19 ⁺ cells are detected only in the lymph nodes and spleen. T cells are actively regenerated in lymph nodes containing single mouse T cells [110]	Истощение и полное исчезновение hCD4 ⁺ Т-клеток в периферической крови [110] Depletion and complete disappearance of hCD4 ⁺ T-cells in peripheral blood [110]
hu-BLT/IL34-Tg/NOG		Эффективное восстановление микроглии человека [81] Effective reconstitution of human microglia [81]	Поддержание репликации ВИЧ в ГМ [81] Maintenance of HIV replication in the brain [81]
hu-BRGST		Восстановление Т-клеток центральной и эффекторной памяти и фолликулярных Т-хелперов, обеспечивающих устойчивые клеточные и гуморальные реакции человека [102], во вторичных лимфоидных тканях с выраженными В-клеточными зонами [103]. Наличие трансгенов HLA класса I и II улучшает развитие и функциональность Т- и В-клеток, включая переключение классов изотипов Ig и антигенспецифические ответы [103] Reconstitution of central and effector memory T cells and follicular T helper cells providing stable human cellular and humoral reactions [102] in secondary lymphoid tissues with pronounced B-cell zones [103]. The presence of HLA class I and II transgenes improve the development and functionality of T and B cells, including switching of Ig isotype classes and antigen-specific responses [103]	—
CD4C/HIV ^{WT} Tg		Экспрессия ВИЧ-1 в клетках мышей, соответствующих клеткам ВИЧ-позитивных людей [114] HIV-1 expression in mouse cells corresponding to cells of HIV-positive humans [114]	Низкая жизнеспособность мышей, существенное снижение моноцитарно-макрофагально-лимфоцитарных клеточных популяций при наличии сопутствующих поражений лёгких и почек [114]

Окончание табл. 2 | End of the Table 2

Мышиная модель Mouse model	Способ инфицирования; патоген Method of infection; pathogen	Анатомо-физиологические свойства Anatomical and physiological features	Патофизиологические свойства Pathophysiological features
GT-tg		Экспрессия белка Tat в ЦНС [116] Tat protein expression in the central nervous system [116]	Low viability of mice, a significant decrease in monocyte-macrophage-lymphocyte cell populations in the presence of concomitant lung and kidney lesions [114]

чена [67], оставляя вопрос о релевантной животной модели ВИЧ-инфекции открытым.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ/REFERENCES

- Berkowitz R., Alexander S., McCune J. Short communication: causal relationships between HIV-1 coreceptor utilization, tropism, and pathogenesis in human thymus. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2000; 16(11): 1039–45. <https://doi.org/10.1089/08892220050075291>
- Sharp P., Hahn B. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2011; 1(1): a006841. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006841>
- Wong J., Yukl S. Tissue reservoirs of HIV. *Curr. Opin. HIV AIDS*. 2016; 11(4): 362–70. <https://doi.org/10.1097/coh.0000000000000293>
- Heyns C., Groeneveld A., Sigarroa N. Urologic complications of HIV and AIDS. *Nat. Clin. Pract. Urol.* 2009; 6(1): 32–43. <https://doi.org/10.1038/ncpuro1273>
- Berger E., Murphy P., Farber J. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: Roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol.* 1999; 17(1): 657–700. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.657>
- Meissner E., Duus K., Loomis R., D'Agostin R., Su L. HIV-1 replication and pathogenesis in the human thymus. *Curr. HIV Res.* 2003; 1(3): 275–85. <https://doi.org/10.2174/1570162033485258>
- Moore J., Kitchen S., Pugach P., Zack J. The CCR5 and CXCR4 coreceptors — central to understanding the transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2004; 20(1): 111–26. <https://doi.org/10.1089/088922204322749567>
- Singh A., Collman R. Heterogeneous spectrum of coreceptor usage among variants within a dualtropic human immunodeficiency virus type 1 primary-isolate quasispecies. *J. Virol.* 2000; 74(21): 10229–35. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.21.10229-10235.2000>
- Doitsh G., Galloway N., Geng X., Yang Z., Monroe K.M., Zepeda O., et al. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature*. 2014; 505(7484): 509–14. <https://doi.org/10.1038/nature12940>
- Ruddle N.H., Akirav E.M. Secondary lymphoid organs: responding to genetic and environmental cues in ontogeny and the immune response. *J. Immunol.* 2009; 183(4): 2205–12. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804324>
- Buettner M., Lochner M. Development and function of secondary and tertiary lymphoid organs in the small intestine and the colon. *Front. Immunol.* 2016; 7: 342. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00342>
- Berkowitz R., van't Wout A., Kootstra N., Moreno M.E., Linquist-Stepps V.D., Bare C., et al. R5 strains of human immunodeficiency virus type 1 from rapid progressors lacking X4 strains do not possess X4-type pathogenicity in human thymus. *J. Virol.* 1999; 73(9): 7817–22. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.9.7817-7822.1999>
- Kwa D., Vingerhoed J., Boeser B., Schuitemaker H. Increased in vitro cytopathicity of CC chemokine receptor 5-restricted human immunodeficiency virus type 1 primary isolates correlates with a progressive clinical course of infection. *J. Infect. Dis.* 2003; 187(9): 1397–403. <https://doi.org/10.1086/374650>
- Hladik F., Sakchalathorn P., Ballweber L., Lentz G., Fialkow M., Eschenbach D., et al. Initial events in establishing vaginal entry and infection by human immunodeficiency virus type-1. *Immunity*. 2007; 26(2): 257–70. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.01.007>
- Ma T., Luo X., George A., Mukherjee G., Sen N., Spitzer T.L., et al. HIV efficiently infects T cells from the endometrium and remodels them to promote systemic viral spread. *Elife*. 2020; 9: e55487. <https://doi.org/10.7554/elife.55487>
- Greco G., Fujimura S., Mourich D., Levy J. Differential effects of human immunodeficiency virus isolates on β -chemokine and gamma interferon production and on cell proliferation. *J. Virol.* 1999; 73(2): 1528–34. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.2.1528-1534.1999>
- Olesen R., Wahl A., Denton P., Victor Garcia J. Immune reconstitution of the female reproductive tract of humanized BLT mice and their susceptibility to human immunodeficiency virus infection. *J. Reprod. Immunol.* 2011; 88(2): 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2010.11.005>
- Guadalupe M., Reay E., Sankaran S., Prindiville T., Flamm J., McNeil A., et al. Severe CD4⁺ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J. Virol.* 2003; 77(21): 11708–17. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.21.11708-11717.2003>
- Brenchley J., Price D., Schacker T., Asher T.E., Silvestri G., Rao S., et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat. Med.* 2006; 12(12): 1365–71. <https://doi.org/10.1038/nm1511>
- Bobardt M., Chatterji U., Selvarajah S., Van der Schueren B., David G., Kahn B., et al. Cell-free human immunodeficiency virus type 1 transcytosis through primary genital epithelial cells. *J. Virol.* 2007; 81(1): 395–405. <https://doi.org/10.1128/jvi.01303-06>
- Nazli A., Chan O., Dobson-Belaire W., Ouellet M., Tremblay M.J., Gray-Owen S.D., et al. Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation. *PLoS Pathog.* 2010; 6(4): e1000852. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000852>
- Avalos C., Abreu C., Queen S., Li M., Price S., Shirk E.N., et al. Brain macrophages in simian immunodeficiency virus-infected, antiretroviral-suppressed macaques: a functional latent reservoir. *mBio*. 2017; 8(4): e01186-17. <https://doi.org/10.1128/mbio.01186-17>

ОБЗОРЫ

23. Electronic Theses of LMU Munich. Baldauf H. Rabbits as a model to study HIV-1 infection and the search for new innate immunity players in resting CD4 T cells. Available at: <https://edoc.ub.uni-muenchen.de/24163/>
24. Baumann J., Unutmaz D., Miller M., Breun S.K., Grill S.M., Mirro J., et al. Murine T cells potently restrict human immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* 2004; 78(22): 12537–47. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.22.12537-12547.2004>
25. Tervo H., Keppler O. High natural permissivity of primary rabbit cells for HIV-1, with a virion infectivity defect in macrophages as the final replication barrier. *J. Virol.* 2010; 84(23): 12300–14. <https://doi.org/10.1128/jvi.01607-10>
26. Sheehy A., Gaddis N., Choi J., Malim M. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature.* 2002; 418(6898): 646–50. <https://doi.org/10.1038/nature00939>
27. Sheehy A., Gaddis N., Malim M. The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat. Med.* 2003; 9(11): 1404–7. <https://doi.org/10.1038/nm945>
28. Stremlau M., Owens C., Perron M., Kiessling M., Autissier P., Sodroski J. The cytoplasmic body component TRIM5α restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature.* 2004; 427(6977): 848–53. <https://doi.org/10.1038/nature02343>
29. Grossman Z., Meier-Schellersheim M., Paul W., Picker L. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat. Med.* 2006; 12(3): 289–95. <https://doi.org/10.1038/nm1380>
30. Levy J. HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges. *AIDS.* 2009; 23(2): 147–60. <https://doi.org/10.1097/qad.0b013e3283217f9f>
31. Ameisen J. Programmed cell death (apoptosis) and cell survival regulation: relevance to AIDS and cancer. *AIDS.* 1994; 8(9): 1197–213. <https://doi.org/10.1097/00002030-199409000-00001>
32. Espert L., Denizot M., Grimaldi M., Robert-Hebmann V., Gay B., Varbanov M., et al. Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4. *J. Clin. Invest.* 2006; 116(8): 2161–72. <https://doi.org/10.1172/jci26185>
33. Zinkernagel R., Hengartner H. T-cell-mediated immunopathology versus direct cytolysis by virus: implications for HIV and AIDS. *Immunol. Today.* 1994; 15(6): 262–8. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(94\)90005-1](https://doi.org/10.1016/0167-5699(94)90005-1)
34. McCune J. The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease. *Nature.* 2001; 410(6831): 974–9. <https://doi.org/10.1038/35073648>
35. Veazey R., Lackner A. Nonhuman primate models and understanding the pathogenesis of HIV infection and AIDS. *ILAR J.* 2017; 58(2): 160–71. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilx032>
36. Takehisa J., Kraus M., Ayouba A., Bailes E., Van Heuverswyn F., Decker J.M., et al. Origin and biology of simian immunodeficiency virus in wild-living western gorillas. *J. Virol.* 2009; 83(4): 1635–48. <https://doi.org/10.1128/jvi.02311-08>
37. Wain L., Bailes E., Bibollet-Ruche F., Decker J.M., Keele B.F., Van Heuverswyn F., et al. Adaptation of HIV-1 to its human host. *Mol. Biol. Evol.* 2007; 24(8): 1853–60. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm110>
38. Novembre F., Saucier M., Anderson D., Klumpp S.A., O'Neil S.P., Brown C.R. 2nd, et al. Development of AIDS in a chimpanzee infected with human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 1997; 71(5): 4086–91. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.5.4086-4091.1997>
39. Mwaengo D., Novembre F. Molecular cloning and characterization of viruses isolated from chimpanzees with pathogenic human immunodeficiency virus type 1 infections. *J. Virol.* 1998; 72(11): 8976–87. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.11.8976-8987.1998>
40. Etienne L., Nerrienet E., LeBreton M., Bibila G.T., Foupou-pouognigni Y., Rousset D., et al. Characterization of a new simian immunodeficiency virus strain in a naturally infected Pan troglodytes troglodyteschimpanzee with AIDS related symptoms. *Retrovirology.* 2011; 8: 4. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-8-4>
41. Takehisa J., Kraus M., Decker J., Li Y., Keele B.F., Bibollet-Ruche F., et al. Generation of infectious molecular clones of simian immunodeficiency virus from fecal consensus sequences of wild chimpanzees. *J. Virol.* 2007; 81(14): 7463–75. <https://doi.org/10.1128/jvi.00551-07>
42. Wall J. Great ape genomics. *ILAR J.* 2013; 54(2): 82–90. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilt048>
43. Palesch D., Bosinger S., Tharp G., Vanderford T.H., Paiardini M., Chahroudi A., et al. Sooty mangabey genome sequence provides insight into AIDS resistance in a natural SIV host. *Nature.* 2018; 553(7686): 77–81. <https://doi.org/10.1038/nature25140>
44. Estes J., Gordon S., Zeng M., Chahroudi A.M., Dunham R.M., Staprans S.I., et al. Early resolution of acute immune activation and induction of PD-1 in SIV-infected sooty mangabeys distinguishes nonpathogenic from pathogenic infection in rhesus macaques. *J. Immunol.* 2008; 180(10): 6798–807. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.10.6798>
45. Silvestri G., Paiardini M., Pandrea I., Lederman M., Sodora D. Understanding the benign nature of SIV infection in natural hosts. *J. Clin. Invest.* 2007; 117(11): 3148–54. <https://doi.org/10.1172/jci33034>
46. Hatzioannou T., Princiotta M., Piatak M. Jr., Yuan F., Zhang F., Lifson J.D., et al. Generation of simian-tropic HIV-1 by restriction factor evasion. *Science.* 2006; 314(5796): 95. <https://doi.org/10.1126/science.1130994>
47. Zaritsky L., Dery A., Leong W., Gama L., Clements J. Tissue-specific interferon alpha subtype response to SIV infection in brain, spleen, and lung. *J. Interferon Cytokine Res.* 2013; 33(1): 24–33. <https://doi.org/10.1089/jir.2012.0018>
48. Calantone N., Wu F., Klase Z., Deleage C., Perkins M., Matsuda K., et al. Tissue myeloid cells in SIV-infected primates acquire viral DNA through phagocytosis of infected T cells. *Immunity.* 2014; 41(3): 493–502. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.08.014>
49. Ulenga N., Sarr A., Thakore-Meloni S., Sankalé J., Eisen G., Kanki P. Relationship between human immunodeficiency type 1 infection and expression of human APOBEC3G and APOBEC3F. *J. Infect. Dis.* 2008; 198(4): 486–92. <https://doi.org/10.1086/590212>
50. Pang W., Song J., Lu Y., Zhang X.L., Zheng H.Y., Jiang J., et al. Host restriction factors APOBEC3G/3F and other interferon-related gene expressions affect early HIV-1 infection in northern pig-tailed macaque (*Macaca leonina*). *Front Immunol.* 2018; 9: 1965. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01965>
51. Brechley J., Schacker T., Ruff L., Price D.A., Taylor J.H., Beilman G.J., et al. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.* 2004; 200(6): 749–59. <https://doi.org/10.1084/jem.20040874>
52. Mehandru S., Poles M., Tenner-Racz K., Horowitz A., Hurlay A., Hogan C., et al. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.* 2004; 200(6): 761–70. <https://doi.org/10.1084/jem.20041196>
53. Veazey R., DeMaria M., Chalifoux L., Shvets D.E., Pauley D.R., Knight H.L., et al. Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T Cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science.* 1998; 280(5362): 427–31. <https://doi.org/10.1126/science.280.5362.427>
54. Veazey R., Mansfield K., Tham I., Carville A.C., Shvets D.E., Forand A.E., et al. Dynamics of CCR5 expression by CD4+ T cells in lymphoid tissues during simian immunodeficiency

- virus infection. *J. Virol.* 2000; 74(23): 11001–7. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.23.11001-11007.2000>
55. Picker L., Hagen S., Lum R., Reed-Inderbitzin E.F., Dady L.M., Sylwester A.W., et al. Insufficient production and tissue delivery of CD4⁺ memory T cells in rapidly progressive simian immunodeficiency virus infection. *J. Exp. Med.* 2004; 200(10): 1299–314. <https://doi.org/10.1084/jem.20041049>
 56. Mattapallil J., Douek D., Hill B., Nishimura Y., Martin M., Rooder M. Massive infection and loss of memory CD4⁺ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature.* 2005; 434(7037): 1093–7. <https://doi.org/10.1038/nature03501>
 57. Zhang Z., Schuler T., Zupancic M., Wietgreffe S., Staskus K.A., Reimann K.A., et al. Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4⁺ T cells. *Science.* 1999; 286(5443): 1353–7. <https://doi.org/10.1126/science.286.5443.1353>
 58. Nowlin B., Burdo T., Midkiff C., Salemi M., Alvarez X., Williams K. SIV encephalitis lesions are composed of CD163⁺ macrophages present in the central nervous system during early SIV infection and SIV-positive macrophages recruited terminally with AIDS. *Am. J. Pathol.* 2015; 185(6): 1649–65. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.01.033>
 59. Micci L., Alvarez X., Irielle R., Ortiz A.M., Ryan E.S., McGary C.S., et al. CD4 depletion in SIV-infected macaques results in macrophage and microglia infection with rapid turnover of infected cells. *PLoS Pathog.* 2014; 10(10): e1004467. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004467>
 60. Carvalho C., Gaspar A., Knight A., Vicente L. Ethical and scientific pitfalls concerning laboratory research with non-human primates, and possible solutions. *Animals (Basel).* 2018; 9(1): 12. <https://doi.org/10.3390/ani9010012>
 61. Rabin L., Hincenbergs M., Moreno M., Warren S., Linquist V., Datema R., et al. Use of standardized SCID-hu Thy/Liv mouse model for preclinical efficacy testing of anti-human immunodeficiency virus type 1 compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996; 40(3): 755–62. <https://doi.org/10.1128/aac.40.3.755>
 62. Camerini D., Su H., Gamez-Torre G., Johnson M., Zack J., Chen I. Human immunodeficiency virus type 1 pathogenesis in SCID-hu mice correlates with syncytium-inducing phenotype and viral replication. *J. Virol.* 2000; 74(7): 3196–204. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.7.3196-3204.2000>
 63. Namikawa R., Weilbaecher K., Kaneshima H., Yee E., McCune J. Long-term human hematopoiesis in the SCID-hu mouse. *J. Exp. Med.* 1990; 172(4): 1055–63. <https://doi.org/10.1084/jem.172.4.1055>
 64. Stoddart C., Geleziunas R., Ferrell S., Linquist-Stepps V., Moreno M.E., Bare C., et al. Human immunodeficiency virus type 1 Nef-mediated downregulation of CD4 correlates with Nef enhancement of viral pathogenesis. *J. Virol.* 2003; 77(3): 2124–33. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.3.2124-2133.2003>
 65. Phillips D., Bourinbaiar A. Mechanism of HIV spread from lymphocytes to epithelia. *Virology.* 1992; 186(1): 261–73. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90080-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90080-9)
 66. Kaizu M., Weiler A., Weisgrau K., Vielhuber K.A., May G., Piaskowski S.M., et al. Repeated intravaginal inoculation with cell-associated simian immunodeficiency virus results in persistent infection of nonhuman primates. *J. Infect. Dis.* 2006; 194(7): 912–6. <https://doi.org/10.1086/507308>
 67. Honeycutt J., Liao B., Nixon C., Cleary R.A., Thayer W.O., Birath S.L., et al. T cells establish and maintain CNS viral infection in HIV-infected humanized mice. *J. Clin. Invest.* 2018; 128(7): 2862–76. <https://doi.org/10.1172/jci98968>
 68. Honeycutt J., Wahl A., Archin N., Choudhary S., Margolis D., Garcia J. HIV-1 infection, response to treatment and establishment of viral latency in a novel humanized T cell-only mouse (TOM) model. *Retrovirology.* 2013; 10: 121. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-121>
 69. Denton P., Estes J., Sun Z., Othieno F.A., Wei B.L., Wege A.K., et al. Antiretroviral pre-exposure prophylaxis prevents vaginal transmission of HIV-1 in humanized BLT mice. *PLoS Med.* 2008; 5(1): e16. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050016>
 70. Wege A., Melkus M., Denton P., Estes J., Garcia J. Functional and phenotypic characterization of the humanized BLT mouse model. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2008; 324: 149–65. https://doi.org/10.1007/978-3-540-75647-7_10
 71. Sun Z., Denton P., Estes J., Othieno F.A., Wei B.L., Wege A.K., et al. Intrarectal transmission, systemic infection, and CD4⁺ T cell depletion in humanized mice infected with HIV-1. *J. Exp. Med.* 2007; 204(4): 705–14. <https://doi.org/10.1084/jem.20062411>
 72. Denton P., Krisko J., Powell D., Mathias M., Kwak Y.T., Martinez-Torres F., et al. Systemic administration of antiretrovirals prior to exposure prevents rectal and intravenous HIV-1 transmission in humanized BLT mice. *PLoS One.* 2010; 5(1): e8829. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008829>
 73. Deruaz M., Murooka T., Ji S., Gavin M.A., Vrbanc V.D., Lieberman J., et al. Chemoattractant-mediated leukocyte trafficking enables HIV dissemination from the genital mucosa. *JCI Insight.* 2017; 2(7): e88533. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.88533>
 74. Nochi T., Denton P., Wahl A., Garcia J. Cryptopatches are essential for the development of human GALT. *Cell Rep.* 2013; 3(6): 1874–84. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.037>
 75. Denton P., Garcia J. Novel humanized murine models for HIV research. *Curr. HIV/AIDS Rep.* 2009; 6(1): 13–9. <https://doi.org/10.1007/s11904-009-0003-2>
 76. Biradar S., Agarwal Y., Lotze M., Rinaldo C., Bility M., Mailiard R. Adoptive transfer of allogeneic gamma delta T cells promotes HIV replication in a humanized mouse model. *bioRxiv.* 2021. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2021.02.08.430263>
 77. Purwar R., Campbell J., Murphy G., Richards W., Clark R., Kupper T. Resident memory T cells (TRM) are abundant in human lung: diversity, function, and antigen specificity. *PLoS One.* 2011; 6(1): e16245. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016245>
 78. Corleis B., Bucsan A., Deruaz M., Vrbanc V.D., Lisanti-Park A.C., Gates S.J., et al. HIV-1 and SIV infection are associated with early loss of lung interstitial CD4⁺ T cells and dissemination of pulmonary tuberculosis. *Cell Rep.* 2019; 26(6): 1409–18.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.021>
 79. Dudek T., Allen T. HIV-specific CD8⁺ T-cell immunity in humanized bone marrow–liver–thymus mice. *J. Infect. Dis.* 2013; 208(Suppl. 2): S150–4. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit320>
 80. Dudek T., No D., Seung E., Vrbanc V.D., Fadda L., Bhoomik P., et al. Rapid evolution of HIV-1 to functional CD8⁺ T cell responses in humanized BLT mice. *Sci. Transl. Med.* 2012; 4(143): 143ra98. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003984>
 81. Zhang J., Lohani S., Cheng Y., Wang T., Guo L., Kim W.K., et al. Human microglia extensively reconstitute in humanized-BLT mice with human interleukin-34 transgene and support HIV-1 brain infection. *Front. Immunol.* 2021; 12: 672415. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.672415>
 82. Llewellyn G., Alvarez-Carbonell D., Chateau M., Karn J., Cannon P. HIV-1 infection of microglial cells in a reconstituted humanized mouse model and identification of compounds that selectively reverse HIV latency. *J. Neurovirol.* 2017; 24(2): 192–203. <https://doi.org/10.1007/s13365-017-0604-2>
 83. Lan P., Tonomura N., Shimizu A., Wang S., Yang Y. Reconstitution of a functional human immune system in immunodeficient mice through combined human fetal thymus/liver and CD34⁺ cell transplantation. *Blood.* 2006; 108(2): 487–92. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-11-4388>

ОБЗОРЫ

84. Ishikawa F., Yasukawa M., Lyons B., Yoshida S., Miyamoto T., Yoshimoto G., et al. Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor γ chain^{null} mice. *Blood*. 2005; 106(5): 1565–73. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-02-0516>
85. Zhang L., Kovalev G., Su L. HIV-1 infection and pathogenesis in a novel humanized mouse model. *Blood*. 2006; 109(7): 2978–81. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-07-033159>
86. Shultz L., Lyons B., Burzinski L., Gott B., Chen X., Chaleff S., et al. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R γ ^{null} mice engrafted with mobilized human hematopoietic stem cells. *J. Immunol.* 2005; 174(10): 6477–89. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.10.6477>
87. Cheng L., Ma J., Li J., Li D., Li G., Li F., et al. Blocking type I interferon signaling enhances T cell recovery and reduces HIV-1 reservoirs. *J. Clin. Invest.* 2016; 127(1): 269–79. <https://doi.org/10.1172/jci90745>
88. Cheng L., Yu H., Li G., Li F., Ma J., Li J., et al. Type I interferons suppress viral replication but contribute to T cell depletion and dysfunction during chronic HIV-1 infection. *JCI Insight*. 2017; 2(12): e94366. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.94366>
89. Zhen A., Rezek V., Youn C., Lam B., Chang N., Rick J., et al. Targeting type I interferon-mediated activation restores immune function in chronic HIV infection. *J. Clin. Invest.* 2016; 127(1): 260–8. <https://doi.org/10.1172/jci89488>
90. Sutter K., Lavender K.J., Messer R.J., Widera M., Williams K., Race B., et al. Concurrent administration of IFN α 14 and CART in TKO-BLT mice enhances suppression of HIV-1 viremia but does not eliminate the Latent Reservoir. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 18089. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54650-9>
91. Lavender K.J., Pang W.W., Messer R.J., Duley A.K., Race B., Phillips K., et al. BLT-humanized C57BL/6 RAG2^{-/-} γ c^{-/-} CD47^{-/-} mice are resistant to GVHD and develop B- and T-cell immunity to HIV infection. *Blood*. 2013; 122(25): 4013–20. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-06-506949>
92. Latinovic O.S., Medina Moreno S., Hippler L.M., Zapata J.C., Redfield R.R. Humanized NSG mouse models of HIV-1 infection and pathogenesis. *Hum. Virol. Retrovirol.* 2016; 3(2). <https://doi.org/10.15406/jhvr.2016.03.00088>
93. Skelton J., Ortega-Prieto A., Dorner M. A Hitchhiker's guide to humanized mice: new pathways to studying viral infections. *Immunology*. 2018; 154(1): 50–61. <https://doi.org/10.1111/imm.12906>
94. Weichseldorfer M., Heredia A., Reitz M., Bryant J., Latinovic O. Use of humanized mouse models for studying HIV-1 infection, pathogenesis and persistence. *J. AIDS HIV Treat.* 2020; 2(1): 23–9. <https://doi.org/10.33696/aids.2.003>
95. Victor Garcia J. Humanized mice for HIV and AIDS research. *Curr. Opin. Virol.* 2016; 19: 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.06.010>
96. Karpel M., Boutwell C., Allen T. BLT humanized mice as a small animal model of HIV infection. *Curr. Opin. Virol.* 2015; 13: 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.05.002>
97. Choudhary S., Rezk N., Ince W., Cheema M., Zhang L., Su L., et al. Suppression of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) viremia with reverse transcriptase and integrase inhibitors, CD4⁺ T-cell recovery, and viral rebound upon interruption of therapy in a new model for HIV treatment in the humanized Rag2^{-/-} γ c^{-/-} mouse. *J. Virol.* 2009; 83(16): 8254–8. <https://doi.org/10.1128/jvi.00580-09>
98. Neff C., Ndolo T., Tandon A., Habu Y., Akkina R. Oral pre-exposure prophylaxis by anti-retrovirals raltegravir and maraviroc protects against HIV-1 vaginal transmission in a humanized mouse model. *PLoS One*. 2010; 5(12): e15257. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015257>
99. Ito M., Hiramatsu H., Kobayashi K., Suzue K., Kawahata M., Hioki K., et al. Nod/SCID/ γ cnul mouse: An excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood*. 2002; 100(9): 3175–82. <https://doi.org/10.1182/blood-2001-12-0207>
100. Hiramatsu H., Nishikomori R., Heike T., Ito M., Kobayashi K., Katamura K., et al. Complete reconstitution of human lymphocytes from cord blood CD34⁺ cells using the nod/SCID/ γ cnul mice model. *Blood*. 2003; 102(3): 873–80. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-09-2755>
101. Watanabe S., Terashima K., Ohta S., Horibata S., Yajima M., Shiozawa Y., et al. Hematopoietic stem cell-engrafted nod/SCID/IL2R γ NULL mice develop human lymphoid systems and induce long-lasting HIV-1 infection with specific humoral immune responses. *Blood*. 2006; 109(1): 212–8. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-017681>
102. Gillgrass A., Wessels J., Yang J., Kaushic C. Advances in humanized mouse models to improve understanding of HIV-1 pathogenesis and immune responses. *Front. Immunol.* 2021; 11: 617516. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.617516>
103. Li Y., Masse-Ranson G., Garcia Z., Bruel T., Kök A., Strick-Marchand H., et al. A human immune system mouse model with robust lymph node development. *Nat. Methods*. 2018; 15(8): 623–30. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0071-6>
104. Honeycutt J., Wahl A., Baker C., Spagnuolo R.A., Foster J., Zakharova O., et al. Macrophages sustain HIV replication in vivo independently of T cells. *J. Clin. Invest.* 2016; 126(4): 1353–66. <https://doi.org/10.1172/jci84456>
105. Cheng L., Ma J., Li G., Su L. Humanized mice engrafted with human HSC only or HSC and thymus support comparable HIV-1 replication, immunopathology, and responses to ART and immune therapy. *Front. Immunol.* 2018; 9: 817. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00817>
106. Godot V., Tcherakian C., Gil L., Cervera-Marzal I., Li G., Cheng L., et al. TLR-9 agonist and CD40-targeting vaccination induces HIV-1 envelope-specific B cells with a diversified immunoglobulin repertoire in humanized mice. *PLoS Pathog.* 2020; 16(11): e1009025. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009025>
107. Wessels J., Lajoie J., Cooper M., Omollo K., Felker A.M., Vitali D., et al. Medroxyprogesterone acetate alters the vaginal microbiota and microenvironment in a Kenyan sex worker cohort and is also associated with increased susceptibility to HIV-1 in humanized mice. *Dis. Model. Mech.* 2019; 12(10): dmm039669. <https://doi.org/10.1242/dmm.039669>
108. Veselinovic M., Preston Neff C., Mulder L., Akkina R. Topical gel formulation of broadly neutralizing anti-HIV-1 monoclonal antibody VRC01 confers protection against HIV-1 vaginal challenge in a humanized mouse model. *Virology*. 2012; 432(2): 505–10. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.06.025>
109. Veselinovic M., Yang K., LeCureux J., Sykes C., Remling-Mulder L., Kashuba A.D.M., et al. HIV pre-exposure prophylaxis: Mucosal tissue drug distribution of RT inhibitor Tenofovir and entry inhibitor Maraviroc in a humanized mouse model. *Virology*. 2014; 464–465: 253–63. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.07.008>
110. Kim K.C., Choi B.S., Kim K.C., Park K.H., Lee H.J., Cho Y.K., et al. A simple mouse model for the Study of Human Immunodeficiency virus. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2016; 32(2): 194–202. <https://doi.org/10.1089/aid.2015.0211>
111. Walsh N.C., Kenney L.L., Jangalwe S., Aryee K.E., Greiner D.L., Brehm M.A., et al. Humanized mouse models of clinical disease. *Annu. Rev. Pathol.* 2017; 12: 187–215. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-052016-100332>
112. Holguin L., Echavarria L., Burnett J.C. Novel humanized peripheral blood mononuclear cell mouse model with delayed onset of graft-versus-host disease for preclinical HIV research. *J. Virol.* 2022; 96(3): e0139421. <https://doi.org/10.1128/jvi.01394-21>

113. Foster J., Garcia J. Role of Nef in HIV-1 replication and pathogenesis. *Adv. Pharmacol.* 2007; 55: 389–409. [https://doi.org/10.1016/s1054-3589\(07\)55011-8](https://doi.org/10.1016/s1054-3589(07)55011-8)
114. Hanna Z., Kay D., Cool M., Jothy S., Rebai N., Jolicoeur P. Transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1 in immune cells develop a severe AIDS-like disease. *J. Virol.* 1998; 72(1): 121–32. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.1.121-132.1998>
115. Hanna Z., Kay D., Rebai N., Guimond A., Jothy S., Jolicoeur P. Nef harbors a major determinant of pathogenicity for an AIDS-like disease induced by HIV-1 in transgenic mice. *Cell.* 1998; 95(2): 163–75. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81748-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81748-1)
116. Paris J., Singh H., Carey A., McLaughlin J. Exposure to HIV-1 Tat in brain impairs sensorimotor gating and activates microglia in limbic and extralimbic brain regions of male mice. *Behav. Brain Res.* 2015; 291: 209–18. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.05.021>
117. Wunderlich M., Chou F., Sexton C., Presicce P., Choungnet C.A., Aliberti J., et al. Improved multilineage human hematopoietic reconstitution and function in NSGS mice. *PLoS One.* 2018; 13(12): e0209034. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209034>
118. Yoshihara S., Li Y., Xia J., Danzl N., Sykes M., Yang Y. Post-transplant hemophagocytic lymphohistiocytosis driven by myeloid cytokines and vicious cycles of T-Cell and macrophage activation in humanized mice. *Front. Immunol.* 2019; 10: 186. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00186>
119. Ivic S., Rochat M., Li D., Audigé A., Schlaepfer E., Münz C., et al. Differential dynamics of HIV infection in humanized MISTRG versus MITRG mice. *ImmunoHorizons.* 2017; 1(8): 162–75. <https://doi.org/10.4049/immunohorizons.1700042>
120. Van Rompay K. Evaluation of antiretrovirals in animal models of HIV infection. *Antiviral. Res.* 2010; 85(1): 159–75. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.07.008>
121. Veazey R.S. Microbicide safety/efficacy studies in animals: macaques and small animal models. *Curr. Opin. HIV AIDS.* 2008; 3(5): 567–73. <https://doi.org/10.1097/coh.0b013e32830891bb>

Информация об авторах

Нагорных Алексей Михайлович[✉] — к.вет.н., с.н.с. научной группы разработки экспериментальных моделей лаб. экспериментальной фармакологии отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, nagornih@cmd.su, <https://orcid.org/0000-0002-8320-2999>

Тюменцева Марина Алексеевна — к.б.н., зав. лаб. геномного редактирования отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3145-3702>

Тюменцев Александр Игоревич — к.б.н., зав. лаб. экспериментальной фармакологии отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0537-2586>

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

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

Статья поступила в редакцию 05.07.2022;
принята к публикации 04.10.2022;
опубликована 30.10.2022

Information about the authors

Aleksey M. Nagornykh[✉] — Cand. Sci. (Vet.), senior researcher, Scientific group of experimental models' development, Laboratory of experimental pharmacology, Department of molecular diagnostics and epidemiology, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, nagornih@cmd.su, <https://orcid.org/0000-0002-8320-2999>

Marina A. Tyumentseva — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of genome editing, Department of molecular diagnostics and epidemiology, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3145-3702>

Aleksandr I. Tyumentsev — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of experimental pharmacology, Department of molecular diagnostics and epidemiology, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0537-2586>

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

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

The article was submitted 05.07.2022;
accepted for publication 04.10.2022;
published 30.10.2022



Вирус Марбург и вызываемое им заболевание

Маркин В.А.[✉]

48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад, Россия

Аннотация

За 50 лет с момента открытия изучены многие свойства вируса Марбург, но надёжных медицинских средств профилактики и лечения вызываемой им инфекции не разработано, хотя он потенциально может вызвать крупномасштабные эпидемии.

Лихорадка Марбург актуальна в связи с риском заноса в другие страны. Источник инфекции в природе — летучие мыши (резервуар) и обезьяны (промежуточный хозяин), а пути передачи — аэрозольный, контактный и алиментарный. Уровень летальности в последних вспышках достигал 90%. Возбудитель выявляли у реконвалесцентов в слезах, сперме и биопсийных материалах печени через недели и месяцы после выздоровления.

Отсутствие лечебно-профилактических противовирусных препаратов, высокие показатели летальности, инфекциозности, способность аэрозольного заражения, высокий эпидемический потенциал в совокупности определяют лихорадку Марбург как серьёзную глобальную угрозу международному здравоохранению. Разработка средств медицинской защиты от данной инфекции должна быть насущной задачей обеспечения биологической безопасности населения России.

Наиболее перспективные пути разработки вакцин против лихорадки Марбург — конструирование рекомбинантов на основе аденовируса, вируса везикулярного стоматита или альфавирусного репликона, ДНК-вакцины. Показано достоверное защитное действие химиопрепарата ремдесивир в сочетании с человеческими антителами, а также этиотропного препарата с антисмысловым механизмом действия и индуктора интерферона. В модельных опытах с псевдовиром найдены принципиально новые пути разработки ингибиторов возбудителя — препятствие выходу его из клеток, а также конструирование антиген-связывающих Fab-фрагментов, ингибирующих синтез вирусной РНК.

Ключевые слова: вирус Марбург, эпидемиология, биология вируса, картина заболевания, пути разработки вакцин, обзор

Источник финансирования. Автор заявляет об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Маркин В.А. Вирус Марбург и вызываемое им заболевание. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(5):605–618.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-273>

Marburg virus and the disease it causes

Vladimir A. Markin[✉]

48 Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Posad, Russia

Abstract

Over the 50 years since its discovery, many properties of the Marburg virus have been studied, but no reliable medical remedies of preventing and treating the infection it causes have been developed, although it can potentially cause large-scale epidemics.

Marburg fever is relevant due to the risk of importation to other countries. The source of infection in nature is bats (reservoir) and monkeys (intermediate host), and the routes of transmission are aerosol, contact and alimentary.

The mortality rate in recent outbreaks has reached 90%. In convalescents the causative agent was identified in tears, semen, and liver biopsies weeks and months after recovery.

The lack of therapeutic and prophylactic antiviral drugs, high rates of mortality, infectivity, the ability of aerosol contamination, and a high epidemic potential all together define Marburg fever as a serious global threat to international health. The development of medical protection against this infection should be an urgent task of ensuring the biological safety of the population of the Russian Federation.

The most promising ways to develop vaccines against Marburg fever are the construction of recombinants based on adenovirus, vesicular stomatitis virus or alphavirus replicon, DNA vaccines. A reliable protective effect of the chemotherapy drug remdesivir in combination with human antibodies, as well as an etiotropic drug with an antisense mechanism of action and an interferon inducer has been shown. In model experiments with pseudovirus, fundamentally new ways of developing pathogen inhibitors were found — preventing its exit from cells, as well as the construction of anti-gene-binding Fab fragments that inhibit the synthesis of viral RNA.

Keywords: Marburg virus, epidemiology, virus biology, disease picture, vaccine development pathways, review

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

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

For citation: Markin V.A. Marburg virus and the disease it causes. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(5):605–618.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-273>

Введение

В 1967 г. произошли одновременные вспышки геморрагической лихорадки в Германии и Югославии, получившей название «лихорадка Марбург» (ЛМ) по месту первоначального выделения вируса. Возбудитель проявил себя в последующих эпидемиях в Африке как чрезвычайно патогенный для человека микроорганизм. Беспрецедентная эпидемия 2013–2016 гг., вызванная близкородственным филовирусом Эбола [1], объявленная ВОЗ чрезвычайной ситуацией, свидетельствует, что и филовирус Марбург (MARV) потенциально может вызвать крупномасштабные эпидемии. В 2018 г. ВОЗ включила обе эти инфекции в список приоритетных заболеваний в контексте чрезвычайных ситуаций в области общественного здравоохранения [2]. За время, прошедшее с момента открытия, изучены многие свойства MARV и вызываемого им заболевания, однако до настоящего времени в практике отсутствуют медицинские средства профилактики и лечения инфекции, что позволяет определить данный возбудитель в случае заноса или биотерроризма как потенциальную биологическую угрозу национальной безопасности России [3].

Цель настоящей работы — обобщение результатов более чем полувекковой истории изучения MARV, достижений в исследовании эпидемиологии, проявлений заболевания, патогенеза инфекции, её диагностики, а также состояния разработки медицинских средств профилактики и лечения данной инфекции.

Таксономия

В соответствии с решением таксономического комитета по вирусам [4] семейство *Filoviridae*, входящее в порядок *Mononegavirales*, состоит из 6 родов: *Ebolavirus*, *Marburgvirus*, *Cuevavirus*, *Dianlovirus*, *Striavirus*, *Thamnovirus*. Наиболее изученными

из них являются вирусы Эбола и MARV, имеющие сходную структуру, вызываемые ими заболевания близки по патогенезу, клиническим проявлениям, тяжести и исходу. Анализ гена гликопротеина (GP) выявил различия в составе нуклеотидов этих вирусов от 37 до 41%. Сиквенс геномов ангольских изолятов на внутривидовом уровне MARV показал вариацию в пределах 7% [5]. Род *Marburgvirus* по этой классификации представлен видом *Marburg marburgvirus*, включающим *Marburgvirus* (MARV) и *Ravnvirus* (RAVV) [4]. По анализу скорости молекулярной эволюции филовирусов S.A. Carroll и соавт. определили, что появление общего предшественника семейства *Filoviridae* произошло около 10 400 лет назад, а MARV — около 700 лет назад [6].

Филогенетический анализ сиквенсов генома вирусов рода *Marburgvirus* показал, что можно выявить по крайней мере 5 линий возбудителей этого рода, из которых 4 очень тесно связаны (последовательности нуклеотидов отличаются до 7%), в то время как пятый отстоит далеко (различия в нуклеотидном составе — 21%) [5]. Поскольку расхождения между их геномами ниже 23% — принятого уровня для классификации видов вирусов по их геномике, то 5 линий MARV были переклассифицированы в 2 вируса: MARV и RAVV [6]. Вирус RAVV был выделен в 1987 г. однократно при вспышке в Демократической Республике Конго (ДРК) в 1998–2000 гг., а также от одного человека и нескольких летучих мышей во время вспышки в Уганде в 2007 г. На **рис. 1** представлена филогения рода *Marburgvirus* [7].

Геномы высокопатогенных для человека изолятов MARV из Анголы и менее патогенных большинства восточноафриканских изолятов возбудителя, а также вызвавших вспышки в 1967 г., отличаются приблизительно на 7%. В то же время не обнаружена корреляция наблюдаемых генетических различий с более высокой патогенностью ви-

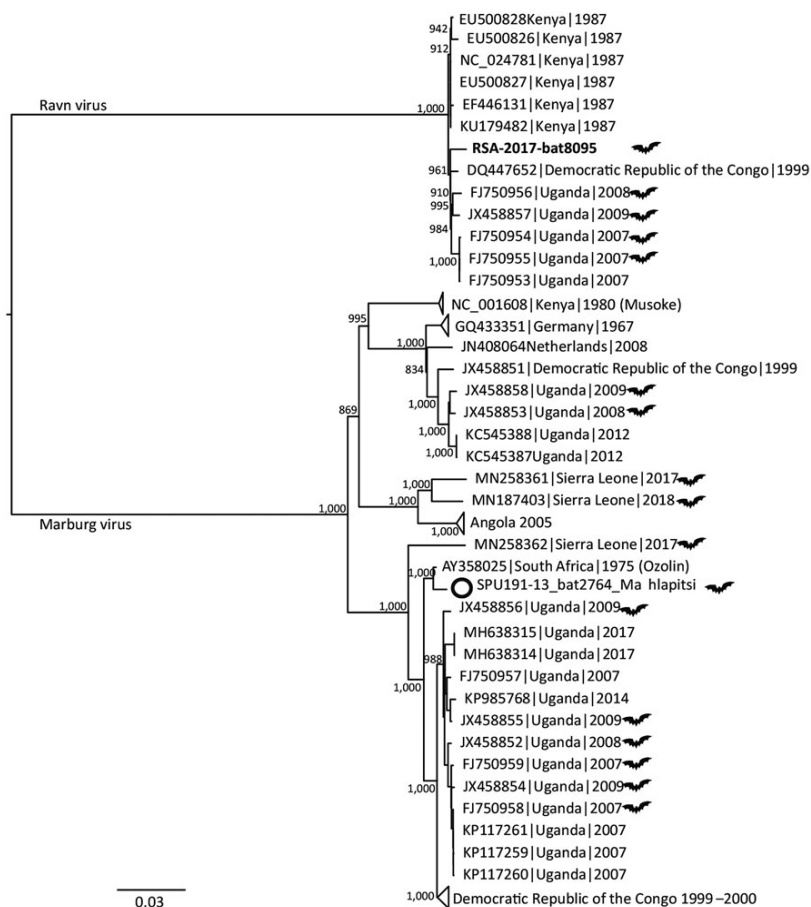


Рис. 1. Филогения рода *Marburgvirus*.

Филогенетическое древо показывает эволюционные отношения видов возбудителя. Указаны регистрационные номера изолятов в GenBank. Изоляты, выделенные из летучих мышей, показаны с использованием символа летучей мыши. Шкала показывает нуклеотидные замены на сайт [7].

Fig. 1. *Marburgvirus* phylogeny.

The phylogenetic tree shows the evolutionary relationships of the pathogen species. The registration numbers of isolates in GenBank are indicated. Isolates from bats are shown using the bat symbol. The scale shows the nucleotide substitutions to the site [7].

руса для людей [5]. В ДРК было выявлено не менее 9 различных вариантов вируса, выделенных от людей в разных вспышках и от животных — природных хозяев MARV. В ангольской вспышке последовательные контактные передачи возбудителя от человека к человеку показали весьма высокую генетическую стабильность вирусного генома данного варианта — даже после 2–3 передач MARV от человека к человеку у изолятов определялись идентичные геномы [8].

Эпидемиология

Ареал филовирусов включает Африку, Южную и Центральную Европу, Юго-Восточную Азию и Китай [8–10]. В августе 1967 г. в Марбурге, Франкфурте и Белграде одновременно заболел 31 сотрудник биологических институтов (25 первичных случаев, 6 вторичных), 7 из которых погибли; ещё 1 вторично инфицированный был диагностирован ретроспективно. Источником MARV явились марышки (*Chlorocebus aethiops*), импортированные из

Уганды одной партией. Кумулятивная летальность в данных вспышках составила 22%. Анализ европейских вспышек показал, что после 2–3 передач MARV от человека человеку его патогенность резко снижалась [11].

Вторая вспышка ЛМ произошла в 1975 г. в Зимбабве. С 1975 по 1997 г. регистрировали только спорадические вспышки этой инфекции на африканском континенте; было выявлено 474 случая заболевания при 377 смертельных исходах (летальность 79,5%) [12]. С учётом изолированности мест обитания людей, неразвитости здравоохранения, вероятно, фактических случаев заболевания было больше [13]. По сообщению Международного общества по инфекционным болезням, последняя вспышка ЛМ в Африке была зарегистрирована в июне 2022 г. в Гане, в которой на 02.08.2022 диагностировано 4 заболевших, 3 из которых в одной семье погибли. Это не первый случай обнаружения MARV в Западной Африке. В 2021 г. было 2 подтверждённых случая

ЛМ в Гвинейской Республике. Ранее вирус был обнаружен в соседней Сьерра-Леоне у нескольких летучих мышей *Rousettus aegyptiacus* [14].

Кроме описанной выше ситуации 1967 г., случаи заноса ЛМ из Африки в другие регионы были зарегистрированы лишь дважды — в 2008 г. возбудитель был интродуцирован в США и Нидерланды [5].

В дополнение к этим случаям заболевания известно о 28 внутрилабораторных заражениях MARV (в том числе 4 — в нашей стране), большая часть пострадавших в которых погибла [12, 15].

Поскольку летальность, связанная с этим заболеванием, а также количество заболевших были существенно ниже, чем при вспышках лихорадки Эбола (до 90%), то долго считали, что ЛМ гораздо менее опасна. Это представление об опасности MARV было пересмотрено после больших вспышек в ДРК в 1998–2000 гг. и затем в крупнейшей зарегистрированной вспышке в Анголе в 2004–2005 гг. Общее количество (469 случаев) и высокая летальность (83% в ДРК и 90% в Анголе) показали, что ЛМ может представлять столь же большую угрозу здоровью населения, как и лихорадка Эбола [2, 3, 12, 16].

В связи с отсутствием вакцины и лечебных противовирусных препаратов, высокими показателями летальности и инфекциозности, а также потенциальной возможностью аэрозольного заражения, работы с MARV ограничиваются лабораториями наивысшего уровня биологической безопасности (BSL-4) [3]. В соответствии с Санитарными правилами MARV отнесён к возбудителям I группы патогенности.

ЛМ считают зоонозом, возбудитель которого сохраняется во внешне здоровом хозяине-резервуаре в эндемичных регионах. Люди и обезьяны — промежуточные хозяева, у которых высокий показатель летальности [17]. Почти все первичные природные инфицирования людей MARV до настоящего времени связаны с контактами с летучими мышами, в том числе с употреблением их в пищу [7, 13]. Эти животные — главный резервуар возбудителя в природе — играют важную роль в цикле его передачи. MARV был обнаружен в популяции нильского крылана — фруктоядной летучей мыши (*R. aegyptiacus*). Геномный анализ изолятов MARV от летучих мышей выявил близость их сиквенсов геномам изолятов от заражённых людей (рис. 1) [7, 17]. Из проверенной 1431 летучей мыши из ЮАР антитела к MARV были выявлены у 53% животных, а у части — к RAVV. Передача MARV среди летучих мышей может происходить вертикально или горизонтально через прямые контакты и, предположительно, через укусы, половые контакты или через членистоногих [16].

Летучие мыши являются естественными резервуарами филовирюсов в 8 странах Азии, Африки и Европы. Генетически дивергентные филовирюсы, обнаруженные у насекомыхоядных летучих мышей *Rousettus* и *Eonycteris* spp. в Китае, показали 61–

99% гомологию с родом *Dianlovirus*; филогенетический анализ выявил также высокую схожесть их нуклеотидов с вирусами MARV и RAVV. Филогенетический анализ частичных последовательностей выявил 3 различные группы филовирюсов, циркулирующих у плодовых летучих мышей в Китае [9].

Основные пути передачи MARV человеку — аэрозольный, контактный и алиментарный. Первичные пациенты с ЛМ, как правило, заражаются вирусом от инфицированных животных: животного-резервуара (летучие мыши видов *R. aegyptiacus*, *Miniopterus inflatus* и *Rhinolophus eloquens*) или промежуточного хозяина, как, например, обезьяны; заражение возможно и при употреблении в пищу продуктов, контаминированных выделениями инфицированных летучих мышей. Последующее распространение MARV между людьми — результат прямого контакта с кровью или другими жидкостями и экскретами (слюна, пот, кал, моча, слезы и грудное молоко) больных [8, 16]. Доказано наличие живого MARV в сперме инфицированных мужчин через 3 мес после выздоровления [15]. Особо эпидемиологически значимые находки вируса — в слезах, сперме и биопсийных материалах печени через недели и месяцы после выздоровления [15], что выдвигает на первый план важность контроля за реконвалесцентами. В экспериментальных исследованиях MARV выявляли длительное время в сперме выживших после заражения обезьян [8, 18, 19]. MARV представляет угрозу в связи с риском заноса в другие страны с путешественниками, импортированными обезьянами и летучими мышами [8, 12, 17].

Структура MARV

Вирионы возбудителя плеоморфны и имеют форму нити, прута, тора, крюка или цифры шесть. Анализ очищенных вирионов показал, что приблизительно 30% вирусных частиц, полученных в инфицированных клетках Vero, были нитевидными, 37% имели форму шестёрки и 33% были торообразными. Длина частиц MARV, по данным разных исследований, составляет до 14 000 нм (в среднем 790–892 нм), а средний диаметр — 80–91 нм. Вирионы MARV окружены мембраной, покрытой шипами длиной 5–10 нм, которые сформированы тримерами вирусного GP [5, 20]. Нуклеокапсид (NC) представляет собой трубчатую структуру с внешним диаметром 45–50 нм и электронно-плотной центральной осью диаметром 19–25 нм. Центральная ось окружена винтовой капсулой с поперечной бороздчатостью с интервалом 5 нм [21]. NC формирует левостороннюю спираль с шагом 7,5 нм при 14,96 выступа на виток с двумя плотными внутренними лепестками за выступающими. Внутренние лепестки представляют нуклеопротеин (NP); NC MARV содержит в среднем 29,92 молекулы NP на виток; с каждой молекулой NP упакованы 6 оснований РНК [22].

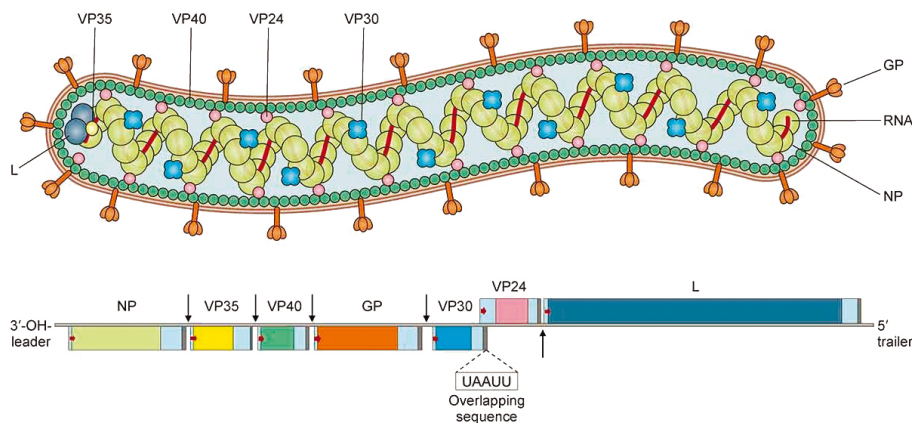


Рис. 2. Структура вириона и организация генома MARV [16].

Fig. 2. Virion structure and organization of the MARV genome [16].

Комплекс NC MARV состоит из геномной РНК и 4 плотно связанных белков: NP, VP35, VP30 и L. Энкапсидация вирусной РНК белками NC защищает её от разрушения РНКазами и от выявления клеточными рецепторами распознавания. Антигенный РНК-репликативный посредник также энкапсидирован его белками. NC служит шаблоном для вирусной транскрипции и репликации [8, 23].

NP энкапсидирует геномную и антигенную РНК и осуществляет взаимодействия с большинством других вирусных белков, приводя к их внутриклеточному перераспределению. NP имеет сильную связь с VP35 и VP30, направляя оба белка во включение в NC. Двусторонний мотив центральной части NP играет важную роль в самосборке и взаимодействии NP-VP35 [8, 20, 23].

Структура вириона MARV представлена на рис. 2 [16].

Организация генома

Несегментированный негативный геном MARV состоит из 19 112 нуклеотидов и содержит 7 моноцистронных генов, кодирующих структурные белки в следующем линейном порядке: 3'-NP-VP35-VP40-GP-VP30-VP24-L-5'. Каждый ген составлен из консервативного сигнального участка начала транскрипции и сигнала остановки на длинных 3'- и 5'-нетранслируемых областях открытой рамки считывания [8]. Гены отделены короткими межгенными областями размерностью 4–97 нуклеотидов или сигналом остановки/начала транскрипции, разделёнными 5 чрезвычайно консервативными нуклеотидами. Трейлерная эксцистронная 5'-область включает 75 нуклеотидов генома MARV и содержит дополнение антигенного репликативного промотера [20]. Организация генома MARV представлена на рис. 2 [16].

Вирусные белки

Единственный поверхностный белок MARV — GP — закодирован четвертым геном и имеет функцию проникновения вируса в клетки. После синтеза в эндоплазматическом ретикулуме прекурсор

GP расщепляется до 2 дисульфидсвязанных субъединиц: GP1 (массой 160 кД) и GP2 (массой 38 кД) [20]. Внешняя область, которая сформирована главным образом GP1, образует связь с факторами входа и рецепторами; трансмембранная субъединица GP2 содержит пептид слияния вирусной и клеточной мембран. GP играет важную роль в уклонении от иммунного надзора и подавляет не только врождённые, но и адаптивную иммунные реакции [8]. Пептид, соответствующий предполагаемой иммунодепрессивной области GP, вызывает гибель лимфоцитов, подавление выработки цитокинов и блокировку активности нейтрализующих антител во время инфекции [24].

Матричный белок VP40 играет главную роль в почковании вирионов, направляя NC от перинуклеарной области к плазматической мембране, активируя функцию GP на местах почкования и выхода частиц. Белок VP40 покрывает внутреннюю сторону мембраны вириона и ассоциирован с NC. После синтеза в цитоплазме инфицированной клетки белок VP40 связывается с клеточными мембранами и накапливается в перепончатых структурах эндосом мультивезикулярных тел [25]. Помимо функции матричного белка, VP40 MARV также действует как фактор патогенности, противодействуя врождённой иммунной реакции и определяя перmissивность хозяина для возбудителя, а также блокирует фосфорилирование киназ Janus, которые играют важную роль в многочисленных сигнальных патогенетических механизмах. У MARV, адаптированного к не- или малоперmissивным животным, таким как мышь или морская свинка, были выявлены мутации в белке VP40. Две изменённые аминокислотные последовательности в VP40 у адаптированного к мышам MARV привели к ингибированию интерферона клеток мыши [26].

Белок VP24 — минорный матричный белок вируса, расположен в непосредственной близости от белков NC и может быть частью данного комплекса [23]. Его незначительная часть (приблизительно 10%) слабо связана с клеточными мембранами, включая

филоподии, а также находится в цитоплазме, перераспределяясь с NC-содержащими включениями и со свободным NC. Белок VP24 важен для выхода вирусных частиц в развитии инфекции — он вовлечён в созревание транспорт-компетентного NC и/или является медиатором взаимодействия между NC и местами почкования в плазматической мембране [8].

Белок VP35 — кофактор полимеразы для транскрипции и ответа. Вместе с каталитической субъединицей белка L белок VP35 формирует зависимый от РНК комплекс РНК-полимеразы. VP35 служит для соединения комплекса NC и белка L. Без VP35 белок L не связывается с NC, служащим шаблоном для вирусной транскрипции и репликации. Белок VP35 возбудителя, помимо функции транскрипции и репликации, действует и как антагонист интерферона — его экспрессии в отсутствие других вирусных белков было достаточно, чтобы полностью заблокировать индукцию интерферона- α в стимулируемых человеческих дендритных клетках [27].

Белок VP30 плотно ассоциирован с NC через закрепление с NP. Роль белка VP30 MARV в транскрипции и репликации возбудителя недостаточно известна; он, вероятно, играет важную роль в вирусной амплификации [8].

Главный компонент комплекса полимеразы MARV — белок L — имеет молекулярную массу 267 кД. Он важен для транскрипции и репликации, формируя вместе с белком VP35 РНК-зависимый РНК-полимеразный комплекс. Белок L имеет ферментативные функции полимеразы. Связывающим сайтом белка VP35 является 530 аминокислотный остаток белка L. Полагают, что полимеразы L MARV выполняет синтез РНК, эспирование и полиаденилирование вирусных мРНК, хотя эти функции не доказаны экспериментально [8, 20].

Репродукция вируса в клетке

В большинстве исследований по циклу размножения MARV использовали неинфекционные рекомбинантные конструкции, проводя эти эксперименты в лабораториях биологической безопасности низкого уровня защиты (BSL-2). Суррогатные системы, моделирующие определённые этапы в цикле репродукции MARV, включают гликопротеиновый псевдо-GP ретровируса или рекомбинантный ген везикуловирусов, экспрессирующие GP, а также минигеномные системы для исследования репликации и транскрипции. Поскольку такие эксперименты дают основу лишь для поверхностного анализа цикла репродукции MARV, их результаты ориентировочны, т.к. все суррогатные системы не соответствуют элементам инфекционного вируса — его морфологии и составу белков моделируемого возбудителя.

Проникновение MARV включает три фазы: прикрепление к клетке, эндоцитоз и слияние. Меди-

атором связывания возбудителя с клеткой и проникновения является GP. Вирус первоначально взаимодействует с молекулами поверхности клеток, GP1 расщепляется эндосомальными протеазами, облегчая закрепление с рецептором входа NPC1. После связывания вирионы MARV подвергаются эндоцитозу, механизм которого остаётся неизвестным. Другой важный процесс в проникновении MARV в клетку — протеолитическое расщепление GP1, происходящее, предположительно, когда вирионы продвигаются в пределах эндоцитозных пузырьков. Для эффективного входа вируса в клетку необходимы расщепление эндосомального GP1 хозяйской эндосомальной цистеиновой протеазой и протеолитическая активация GP1 эндосомальными протеазами, облегчающими закрепление рецептора обязательной области к эндосомальному фактору Niemann–Pick — белка C1 [8, 20, 28]. Вирусный NP выходит в цитозоль клетки и запускает транскрипцию вирусного генома; мРНК автоматически транслирует информацию клетке-хозяину. Синтез GP происходит в эндоплазматическом ретикулуме и подвергается многократным посттрансляционным модификациям. Положительные смысловые антигеномы синтезируются от поступающих вирусных геномов и служат шаблонами для копирования новых смысловых отрицательных геномов. После расщепления в аппарате Гольджи GP вириона транспортируются к мультивезикулярным телам и к клеточной мембране, где происходит сборка. NC и белок VP24 также принимают участие в сборке, которую ведёт белок VP40 [20, 28].

Синтезированные NC мигрируют к месту почкования вируса — апикальной мембране [28]. Выход вирионов определяет главным образом белок VP40 через инклюзию NC в плазматические мембраны. Индуцированное белком VP40 почкование усиливают белки NP, GP и VP24 [26]. Считают, что MARV может почковаться непосредственно в смежные клетки через установленный филоподиями межклеточный контакт [8]. Электронные томографические исследования инфицированных MARV клеток показали, что процесс почкования начинается, когда внутриклеточные NC ассоциируются с латеральной стороны плазматической мембраны. Плазматическая мембрана энкапсидирует NC, и вирионы выходят на поверхность клетки. Выход нитевидного MARV из инфицированных клеток достигает максимума через 1–2 сут после заражения, когда клетки внешне ещё не повреждены. На 4-е сутки после инфицирования большинство клеток везикулируются, а вышедшие вирионы имеют форму круга или согнуты, их инфекциозность снижена [21].

Патогенез

Вирус проникает через повреждения кожи или мембраны слизистых оболочек. В периоде инкубации патологические изменения начинают

формироваться на биохимическом уровне, а также проявляться в активизации системы иммунитета. Во время инкубационного периода вирус размножается в лимфатических узлах, селезёнке и, возможно, в фиксированных макрофагах различных органов. У людей и животных клетки мононуклеарной системы фагоцитов, включая моноциты, макрофаги и дендритные клетки, являются для MARV первоначальными мишенями; они очень восприимчивы к нему и продуцируют инфекционный возбудитель. Начальные места репродукции вируса — лимфатические узлы, печень и селезёнка, где происходят самые тяжёлые некротические повреждения [8, 29]. Эти органы содержат большое количество моноцитов и макрофагов, миграция которых после заражения в окружающие ткани, а также транспорт свободного вируса через лимфу или кровоток облегчают, на наш взгляд, диссеминацию возбудителя, приводящую к системной инфекции. Свободный вирус появляется в тканях и органах заражённых животных, а высокие концентрации вируса обнаруживаются в крови [29]. Помимо моноцитов, макрофагов и дендритных клеток перmissive для MARV гепатоциты, клетки коры надпочечника, медуллярные клетки и фибробласты [28, 29].

В период продromы появляются неспецифические симптомы болезни; больные, как правило, не заразы. Период острого лихорадочного заболевания сопровождается высокой вирусемией и диссеминацией MARV по всем внутренним органам. В стадии разгара, внешне проявляющейся выраженной специфической симптоматикой, происходят все основные патологические процессы, часто приводящие больных к гибели. Патологические микроскопические изменения проявляются в генерализованных очаговых некрозах гепатоцитов с небольшими очажками воспаления, вызывающими нарушения функции печени. В селезёнке и лимфатических узлах появляются некрозы фолликулов, иногда сопровождаемые гиперплазией элементов ретикулоэндотелия. Несколько позже в органах появляются рассеянные геморрагии, особенно в желудочно-кишечном тракте, и диссеминированные внутрисосудистые коагуляции. На фоне этих явлений развиваются интерстициальная пневмония, панкреатит, орхит, иридоциклит и т.д. Поражение макроорганизма происходит на всех уровнях организации — от молекулярного до популяционного, о чём свидетельствуют молекулярно-биологические, вирусологические, биохимические, морфологические, цитохимические, серологические, клинические и эпидемиологические методы исследования ЛМ. Эндотелиальные клетки многих тканей поражаются при заключительной стадии ЛМ [16, 28–31]. На поздних стадиях инфекции MARV может быть выделен почти из каждого органа. Несмотря на высокий уровень концентрации возбудителя и некро-

тические повреждения в заражённых тканях и органах, наблюдают только незначительное воспаление, связанное с разрегулией иммунных реакций. Выраженная патология печени влияет на синтез факторов свёртывания крови и способствует наблюдаемым дефектам коагуляции при ЛМ [16, 29]. Указанные патологические последствия размножения вируса в органах вызывают мультиорганный отказ с фатальным исходом [16].

На стадии реконвалесценции происходит нормализация функций органов. Иммунные ответы у людей при ЛМ недостаточно изучены. У выживших больных выявляли выработку вируснейтрализующих антител, титр которых снижался через 21 мес после заражения, а через 27 мес они исчезали [16]. Для сравнения, при лихорадке Эбола у реконвалесцентов вначале нарастают титры иммуноглобулинов М, а затем G и A; у погибающих иммуноглобулины в крови отсутствуют [15].

Механизм реализации патогенности возбудителя связан с прямым и опосредованным действием MARV, что проявляется гибелью клеток в результате размножения в них вируса и извращением защитных реакций организма. В качестве патогена выступают не только реплицирующийся MARV, но и секретируемый GP, а кроме этого — инициированные ими аутоантитела, цитокины, приводящие к нарушениям гомеостаза и развитию основного при ЛМ синдрома — диссеминированного внутрисосудистого свёртывания, приводящего к образованию тромбов в сосудах микроциркуляторного русла в сочетании с несвёртываемостью крови, выражающейся множественными массивными кровоизлияниями. Пусковым механизмом развития этого синдрома является выброс в кровь из лизированных MARV мононуклеарных фагоцитов цитокинов, в том числе фактора некроза опухоли- α (ФНО- α) [31]. Клетки после репродукции в них вируса остаются функционально способны, однако на их наружной поверхности при выходе возбудителя через клеточную мембрану остаётся GP, не востребованный при сборке, являющийся «мишенью» для Т-лимфоцитов. Атака их на эти участки приводит к разрушению жизнеспособных клеток и появлению зон некроза [8, 20]. В результате «цитокинового шторма», вызванного прямым и опосредованным действием вирусных белков на макрофаги, эндотелиальные и тучные клетки с выбросом ими цитокинов (ФНО- α , интерлейкинов-1, -6, -8 и др.), происходят нарастающие нарушения микроциркуляции, гемодинамики, свёртывания крови, метаболизма и функционирования органов, инициации, развития и реализации специфического иммунитета. Особое значение среди них в развитии ЛМ имеет ФНО- α [30, 31].

Причиной развития разнообразных клинических проявлений при ЛМ является каскадная активация комплемента, фагоцитов, свёртывающей

системы крови, приводящая к резкому нерегулируемому повышению уровня медиаторов воспаления и иммунного ответа в целом. Данный каскад событий с активацией Т-лимфоцитов, нейтрофилов и тромбоцитов приводит к неконтролируемому выбросу в кровь разнообразных биологически активных веществ — естественные защитные реакции становятся аутоагрессивными, разбалансирующими систему гомеостаза по принципу «порочного круга». Развивается инфекционно-токсический шок с выработкой медиаторов воспаления, индуцирующих многочисленные повреждения разных структурно-функциональных систем [31]. Первичные моноциты и макрофаги человека, активированные MARV, *in vitro* вырабатывают воспалительные цитокины. Данные об уровнях цитокинов в сыворотках больных ЛМ пациентов не известны [8, 20]. В целом заражение MARV вызывает увеличение выработки воспалительных цитокинов и высокие уровни хемокинов, но молекулярные механизмы, приводящие к этим изменениям, недостаточно известны.

Инфекция у лабораторных животных

Течение ЛМ исследовали на обезьянах, мышах, морских свинках и хомячках. Павлины гамадрилы, циномогусы, макаки резус и африканские зелёные мартышки в наибольшей степени воспроизводят симптомы и патологию ЛМ, наблюдаемую у людей, с близкой летальностью. Смерть у обезьян наступает через 6–13 сут от момента заражения при развитии тромбоцитопении, лимфопении, нарушении свёртывания крови и с кровоизлияниями [29–32].

Грызуны с неповреждённой иммунной системой не заболевают после заражения природным MARV. Штаммы Musoke, C167 MARV и вирус RAVV путём последовательных пассажей были адаптированы к мышам, морским свинкам и хомячкам, однако нарушения коагуляции, развитие типичной сыпи и геморрагических проявлений, как у обезьян, были у них не выражены. Сравнение сиквенсов последовательностей выявило мутации в открытых рамках считывания белков NP, VP35, VP40, VP30 и в вирусной полимеразе L у адаптированных к грызунам вариантах MARV [8, 20].

Проявления инфекции у людей

MARV является одним из самых патогенных и опасных вирусов, поражающих людей. Не зарегистрировано ни одного случая инаппарантного течения ЛМ у человека [8, 20]. Клинические наблюдения во время вспышек 1967 г. в Германии и Югославии, 1998–2000 гг. в ДРК и 2004–2005 гг. в Анголе показали, что при схожести большинства симптомов летальность была значительно выше в последних вспышках ЛМ [11, 15]. Инкубационный период, рассчитанный по самым достоверным зарегистриро-

ванным случаям заболевания, находится в пределах 3–21 сут (как правило, 5–10 сут) [11, 15, 16].

ЛМ протекает в 3 фазы: инициация, генерализация, исход.

Инициация (как правило, 1–4-е сутки от момента заражения) характерна гриппоподобными признаками: высокой температурой, сильной головной болью, ознобом, миалгией, недомоганием и иногда прострацией. У 50–75% пациентов это сопровождается быстрым истощением, характеризующимся желудочно-кишечными симптомами, включая анорексию, боль в животе, тошноту, рвоту и диарею.

Генерализация (5–13-е сутки) — сохраняются многие начальные признаки инфекции, в том числе высокая температура. Начиная с 4–5-х суток болезни развиваются сыпь, дисфагия и фарингит. Макуло-папулёзная сыпь, как правило, является первой отличительной особенностью, указывающей на филовирусную инфекцию; неспецифические проявления включают увеличение лимфатических узлов, лейкопению и тромбоцитопению. Дополнительно могут появиться неврологические и психические признаки, включая энцефалит, спутанность сознания, бред, агрессию и раздражительность. Развиваются нарушения сосудистой проницаемости, особенно инъекция конъюнктивы глаз и отёки. Более чем у 75% пациентов появляется геморрагический синдром: петехии, кровотечения, мелена, кровавый понос, кровавая рвота и экхимозы. Поражены многие органы, включая поджелудочную железу, почки и печень.

Исход (13-е сутки) приводит к гибели или выздоровлению пациентов. Типичные предагональные признаки включают беспокойство, спутанность сознания, слабоумие, конвульсии, замедление циркуляции крови из-за тяжёлого обезвоживания, расстройство обмена веществ, тяжёлую диффузную коагулопатию, мультиорганные отказы, шок и кому. Гибель, как правило, происходит на 8–16-е сутки болезни. В несмертельных случаях период выздоровления длительный с проявлениями миалгии, истощения, потливости, очищения кожи на местах сыпи, частичной амнезией и развитием вторичных инфекций [11, 12, 15, 16, 31–33].

Диагностика

Для выявления MARV разработаны вирусологические, серологические и молекулярные диагностические методы, включая выделение возбудителя, определение его видовой принадлежности в реакции связывания комплемента, реакции нейтрализации, иммуноферментном анализе, полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), иммуноэлектронной микроскопии, иммуногистохимически и электрохимически [2, 8, 12, 15, 33, 34].

Экспрессный анализ с применением NP или GP MARV позволяет в иммуноферментном ана-

лизе обнаруживать вирусспецифические антитела к возбудителю, а исследование с моноклональными антителами выявляет вирусный антиген. В 48 ЦНИИ Минобороны России созданы тест-системы иммуноферментные для выявления антигенов вирусов Марбург и Эбола, а также антител к ним. Показатели их специфичности и воспроизводимости по результатам испытаний — не ниже 95%; чувствительность тест-систем для выявления антигенов вирусов составляет не менее 4,5 Ig БОЕ/мл. Тест-системы иммуноферментные для выявления антигенов вирусов Марбург и Эбола, а также антител к ним внедрены в практику здравоохранения России [32].

В повседневной практике наиболее приемлем метод ОТ-ПЦР, выявляющий гены GP или NP; он позволяет работать с инактивированными пробами от больных. Модификация ОТ-ПЦР в режиме реального времени с использованием флуоресцентных зондов типа TaqMan (диагностикум «Marburg-TM:pan») позволяет выявлять 0,1–10 БОЕ/PCR штаммов Ci67, Musoke и Angola-TM вируса MARV и вирус RAVV [34].

Согласно результатам наших исследований, вирусологический метод наиболее чувствителен из способов индикации жизнеспособного возбудителя в пробах — пассажами через новорождённых мышшей удаётся накопить и выявить минимальные концентрации возбудителя в материалах, не выявляемые в них другими методами. Недостатки данного метода — длительность анализа, высокая себестоимость и необходимость работы в лабораториях высшего уровня защиты (BSL-4).

Разработка вакцин

Отечественные и зарубежные подходы с использованием инактивированного вируса как кандидатной вакцины против ЛМ были неудачны или имели противоречивые результаты [8, 32, 35].

Рекомбинантный GP, экспрессированный в клетках насекомых, и основанные на выработке специфического GP ДНК-вакцины защищали лишь часть инфицированных морских свинок, но использование комбинации обоих этих препаратов привело к выживанию 100% этих животных [36, 37]. По сравнению с другими кандидатными препаратами при использовании ДНК-вакцин наблюдали низкую выработку вирусспецифических антител. В исследованиях на людях 2 кандидатные ДНК-вакцины против ЛМ имели низкую иммуногенность и были неспособны вызвать долгосрочный иммунитет [37]. Кодон-оптимизированная ДНК-вакцина генерировала сильный антительный ответ и защитила всех заражённых мышшей [8]. Кандидатные вакцины, основанные на репликативной основе вируса Венесуэльского эфефаломииелита лошадей, экспрессирующие GP MARV наряду с NP или только GP, защища-

ли от гибели всех инфицированных морских свинок и обезьян [38].

Созданы другие системы, экспрессирующие GP MARV, основанные на рекомбинантных репликативно-дефектных векторах — аденовирусном или вирусе везикулярного стоматита (VVS). Основанная на аденовирусе конструкция успешно защищала морских свинок и обезьян от гибели, обеспечивая перекрёстную межштаммовую защиту Марбург-специфическими IgG и Т-клетками [39]. Препарат, сконструированный на платформе VVS, экспрессировал GP штамма Musoke MARV и обеспечил 100% защиту от гибели обезьян, заражённых внутримышечно или аэрозольно вирусом RAVV или штаммом Angola MARV; успешным было применение его и после заражения животных. Специфические нейтрализующие IgG у животных имели низкие уровни. У обезьян, привитых этим рекомбинантом, Т-клеточных ответов не было [40, 41]. Основанная на платформе VVS филовиральная кандидатная GP-вакцина rVSV-MARV-GP в дозе 10^7 БОЕ защищала от гибели мышшей с ослабленным иммунитетом, а также обезьян (*Macaca fascicularis*) и не проявляла нейровирулентности [37, 42].

Препарат, сконструированный из вирусоподобных частиц, содержащих GP MARV, индуцировал вирусспецифические антитела и обеспечивал защиту морских свинок от гибели. Механизм его действия состоял в активировании Т-клеток CD4⁺. Вирусоподобные частицы, содержащие GP штамма Musoke MARV, обеспечили перекрёстную защиту морских свинок и обезьян, инфицированных штаммом Ci67 MARV или вирусом RAVV [43].

Перекрёстной защиты от вируса Эбола не было у животных, привитых препаратами против ЛМ, но комбинированные вакцины были успешны в защите от обоих вирусов, а также вируса RAVV [35, 44].

В опытах на обезьянах высокоэффективными были 14 кандидатных вакцин против ЛМ — рекомбинантные аденовирусные, на основе VVS или альфовирусного репликона, ДНК-вакцины, вирусоподобные частицы и некоторые их комбинации [8, 37, 44]. Однако ни один из этих препаратов не рекомендован для медицинского применения [8, 37]. Две кандидатные вакцины против ЛМ (сAd3 и MARV DNA) проходят первую фазу клинических испытаний, а препарат MVA-BN-Filo — вторую [15, 37, 45].

Лечение

До настоящего времени не разработано специфического лечения ЛМ в эпидочагах. Во время эпидемических вспышек основной была поддерживающая терапия (кровозамещающие жидкости, антибактериальные препараты, переливание крови), не дававшая существенных результатов [8, 12, 32, 33].

Лечение пациентов сыворотками реконвалесцентов или иммуноглобулинами было, как правило, мало-результативным [8, 32, 33, 46], что связано, скорее всего, с их поздним применением. Однако введение человеческих специфических моноклональных антител обезьянам вплоть до 5-х суток от заражения защищало животных от гибели [47, 48].

В 48 ЦНИИ Минобороны России более 20 лет назад были разработаны специфические лошадиные иммуноглобулины для экстренной профилактики лихорадок Марбург и Эбола. Введение их через 2 ч после заражения защищает 100% павианов гамадрилов и морских свинок от заражения 10–30 ЛД₅₀ возбудителя [32]. Иммуноглобулины против лихорадок Эбола и Марбург из сыворотки крови лошадей жидкие внедрены в практику здравоохранения России. Экстренная терапия, начатая сразу после заражения, важна для предотвращения болезни в случае внутрилабораторного инфицирования.

В лабораторных исследованиях оценены следующие направления разработки средств лечения ЛМ. Иммуномодуляторы были малоэффективны — лишь 1 из 6 заражённых MARV обезьян выжила после лечения рекомбинантным коагулирующим белком-2 нематоды [49]. Антисмысловая технология была эффективнее — экстренное введение фосфородиамидатных морфолиновых олигомеров для блокирования экспрессии вирусного белка, начатое спустя 30–60 мин после заражения MARV, полностью защищало обезьян от гибели [50]. Комбинированная терапия химиопрепаратом широкого спектра действия ремдесивиром и человеческими антителами против MARV обеспечила защиту 80% обезьян, в то время как лечение только ремдесивиром или только антителами лечебного эффекта не имело [51, 52]. Как средство экстренной профилактики была эффективна векторная вакцина на платформе VVS, экспрессирующая GP MARV. Отмечено выживание 100% обезьян, когда кандидатную вакцину rVSV-MARV-GP вводили спустя 20–30 мин после заражения [53].

В последнее время разрабатывают принципиально новые пути создания ингибиторов MARV, однако они основаны на модельных опытах с псевдовиром [54]. Так, получено соединение FC-10696, препятствующее выходу вирусоподобных частиц, содержащих VP40, и жизнеспособного MARV из клеток HeLa или первичных макрофагов человека. Введённый мышам препарат ослаблял проявления инфекции и защитил от гибели 14% животных [55]. Другой новый путь направлен на конструирование антигенсвязывающих Fab-фрагментов. Создано синтетическое антитело sFab H3, которое связывает белок VP35 MARV, являющийся критическим кофактором комплекса репликации вируса и антагонистом противовирусного иммунитета. Неполное антитело sFab H3 ингибировало синтез вирусной

РНК в минигеномном анализе, что позволяет предположить возможность его потенциального использования в качестве антивирусного средства [56, 57].

Заключение

За 55-летнюю историю исследований MARV в Германии, США, Великобритании, России, Италии, Японии, Китае в гражданских и военных лабораториях наивысшего уровня защиты получены обширные данные по биологии возбудителя, в полевых условиях выявлены эпидемиологические особенности вызываемой им особо опасной инфекции человека, изучена экология вируса. Ареал представителей семейства *Filoviridae*, включающего род *Marburgvirus*, распространён в Африке, Южной и Центральной Европе, Юго-Восточной Азии и Китае. Два представителя этого семейства — вирусы Эбола и Марбург — являются одними из самых патогенных возбудителей заболеваний человека; опасность вирусов других родов филовирусов для человека малоизвестна.

Почти 30-летняя разработка средств и методов профилактики и лечения ЛМ дала некоторые результаты для практической медицины. Определено, что оценку эффективности препаратов целесообразно проводить на обезьянах, в наибольшей степени воспроизводящих симптомы и патологию, наблюдаемую у людей. В условиях чрезвычайной ситуации в области здравоохранения новые и альтернативные подходы к разработке вакцин необходимы для быстрой и массовой вакцинации, управления вспышкой заболевания и сокращения распространения эпидемии [58], что определило необходимость исследования разных путей разработки вакцин против ЛМ. Выявлены наиболее перспективные направления этой работы — конструирование рекомбинантов на основе аденовируса, VVS или альфа-вирусного репликона, ДНК-вакцины; 3 кандидатные вакцины из них проходят I–II фазы клинических испытаний. В лабораторных исследованиях показано достоверное защитное действие химиопрепарата ремдесивир в сочетании с человеческими антителами против MARV, а также этиотропного препарата с антисмысловым механизмом действия и индуктора интерферона. В модельных опытах с псевдовиром найдены принципиально новые пути разработки ингибиторов возбудителя — препятствие выходу его из клеток, а также конструирование антигенсвязывающих Fab-фрагментов, ингибирующих синтез вирусной РНК. Единственный препарат, внедрённый лишь в практику здравоохранения России, — жидкий специфический лошадиный иммуноглобулин для экстренной профилактики ЛМ.

MARV представляет собой биологическую угрозу в связи с риском заноса его в нашу страну с туристами, импортированными обезьянами, летучими мышами или в случае биотерроризма. Особую

эпидемическую значимость имеет персистенция вируса в тканях глаз, яичек и печени реконвалесцентов в течение месяцев после выздоровления. С учётом отсутствующих до настоящего времени средств профилактики и лечения ЛМ разработка защитных препаратов является насущной задачей обеспечения биологической безопасности России.

Возможное распространение новых для России особо опасных инфекций, таких как ЛМ, требует дальнейшего развития системы медико-биологических, санитарно-эпидемиологических, информационных и других мер, направленных на защиту населения от этих заболеваний.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Jacob S.T., Crozier I., Fischer W.A. 2nd, Hewlett A., Kraft C.S., Vega M.A., et al. Ebola virus disease. *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2020; 6(1): 13. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0147-3>
- WHO. Prioritizing diseases for research and development in emergency contexts. Geneva; 2018. Available at: <https://www.who.int/blueprint/priority-diseases/en/>
- O'Brien C., Varty K., Ignaszak A. The electrochemical detection of bioterrorism agents: A review of the detection, diagnostics, and implementation of sensors in biosafety programs for class A bioweapons. *Microsyst. Nanoeng.* 2021; 7: 16. <https://doi.org/10.1038/s41378-021-00242-5>
- Kuhn J.H., Adachi T., Adhikari N.K.J., Arribas J.R., Bah I.E. New filovirus disease classification and nomenclature. *Nat. Rev. Microbiol.* 2019; 17(5): 261–3. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0187-4>
- Brauburger K., Hume A.J., Muhlberger E., Olejnik J. Forty-five years of Marburg virus research. *Viruses*. 2012; 4: 1878–27. <https://doi.org/10.3390/v4101878>
- Carroll S.A., Towner J.S., Sealy T.K. Molecular evolution of viruses of the family Filoviridae based on 97 whole genome sequences. *J. Virol.* 2013; 87(5): 2608–16. <https://doi.org/10.1128/JVI.03118-12>
- Pawęska J.T., Storm N., Markotter W., Paola N.D., Wiley M.R., Palacios G., et al. Shedding of Marburg virus in naturally infected Egyptian Rousette bats, South Africa, 2017. *Emerg. Infect. Dis.* 2020; 26(12): 3051–5. <https://doi.org/10.3201/eid2612.202108>
- Olejnik J., Muhlberger E., Hume A.J. Recent advances in marburgvirus research. *F1000Res*. 2019; 8: F1000 Faculty Rev-704. <https://doi.org/10.12688/f1000research.17573.1>
- Yang X.L., Zhang Y.Z., Jiang R.D. Genetically diverse filoviruses in Rousettus and Eonycteris spp. bats, China, 2009 and 2015. *Emerg. Infect. Dis.* 2017; 23(3): 482–6. <https://doi.org/10.3201/eid2303.161119>
- Поршаков А.М., Кононова Ю.В., Льюнг Т. Филовирусы Юго-Восточной Азии, Китая и Европы (обзор литературы). *Журнал инфектологии*. 2019; 11(2): 5–13. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2019-11-2-5-13>
- Ristanović E.S., Kokoškov N.S., Crozier I., Kuhn J.H., Gligić A.S. A forgotten episode of Marburg virus disease: Belgrade, Yugoslavia, 1967. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2020; 84(2): e00095-19. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00095-19>
- Bauer M.P., Timen A., Vossen A.C.T.M., van Disse J.T.I. Marburg haemorrhagic fever in returning travellers: An overview aimed at clinicians. *Clin. Microbiol. Infect.* 2019; 21S: e28–e31. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12673>
- Nyakarahuka L., Shoemaker T.R., Balinandi S., Chemos G., Kwesiga B., Mulei S., et al. Marburg virus disease outbreak in Kween District Uganda, 2017: Epidemiological and laboratory findings. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2019; 13(3): e0007257. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007257>
- WHO. Ghana declares first-ever outbreak of Marburg virus disease; 2022. Available at: <https://www.afro.who.int/countries/ghana/news/ghana-declares-first-ever-outbreak-marburg-virus-disease-0>
- Kortepeter M.G., Dierberg K.D., Shenoy E.S., Cieslak T.J. Marburg virus disease: A summary for clinicians. *Int. J. Infect. Dis.* 2020; 99: 233–42. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.07.042>
- Abir M.H., Rahman T., Das A., Etu S.N., Nafiz I.H., Rakib A., et al. Pathogenicity and virulence of Marburg virus. *Virulence*. 2022; 13(1): 609–33. <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2054760>
- Amman B.R., Schuh A.J., Albariño C.G., Towner J.S. Marburg virus persistence on fruit as a plausible route of bat to primate filovirus transmission. *Viruses*. 2021; 13(12): 2394. <https://doi.org/10.3390/v13122394>
- Coffin K.M., Liu J., Warren T.K., Blancett C.D., Kuehl K.A., Nichols D.K., et al. Persistent Marburg virus infection in the testes of nonhuman primate survivors. *Cell. Host. Microbe*. 2018; 24(3): 405–16.e3. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.08.003>
- Higgs E.S., Gayedy-Dennis D., Fisher W., Nason M., Reilly C., Beavogui A.H., et al. PREVAIL IV: A randomized, double-blind, two-phase, phase 2 trial of remdesivir versus placebo for reduction of Ebola virus RNA in the semen of male survivors. *Clin. Infect. Dis.* 2021; 73(10): 1849–56. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab215>
- Emanuel J., Marzi A., Feldmann H. Filoviruses: Ecology, molecular biology, and evolution. *Adv. Virus. Res.* 2018; 100: 189221. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2017.12.002>
- Welsch S., Kolesnikova L., Krahling V., Riches J.D., Becker S., Briggs J.A. Electron tomography reveals the steps in filovirus budding. *PLoS Pathog.* 2010; 6(4): e1000875. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000875>
- Bharat T.A., Riches J.D., Kolesnikova L., Welsch S., Krahling V., Davey N., et al. Cryo-electron tomography of Marburg virus particles and their morphogenesis within infected cells. *PLoS Biol.* 2011; 9(11): e1001196. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001196>
- Bamberg S., Kolesnikova L., Möller P., Klenk H.D., Becker S. VP24 of Marburg virus influences formation of infectious particles. *J. Virol.* 2005; 79(21): 13421–33. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.21.13421-13433.2005>
- Yaddanapudi K., Palacios G., Towner J.S., Chen I., Sariol C.A., Nichol S.T., et al. Implication of a retrovirus-like glycoprotein peptide in the immunopathogenesis of Ebola and Marburg viruses. *Faseb. J.* 2006; 20: 2519–30. <https://doi.org/10.1096/fj.06-6151com>
- Amiar S., Husby M.L., Wijesinghe K.J., Angel S., Bhattarai N., Gerstman B.S., et al. Lipid-specific oligomerization of the Marburg virus matrix protein VP40 is regulated by two distinct interfaces for virion assembly. *J. Biol. Chem.* 2021; 296: 100796. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100796>
- Koehler A., Pfeiffer S., Kolesnikova L., Becker S. Analysis of the multifunctionality of Marburg virus VP40. *J. Gen. Virol.* 2018; 99(12): 1614–20. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001169>
- Hume A., Muhlberger E. Marburg virus viral protein 35 inhibits protein kinase R activation in a cell type-specific manner. *J. Infect. Dis.* 2018; 218(Suppl. 5): S403–8. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy473>
- Schnittler H.J., Mahner F., Drenckhahn D., Klenk H.D., Feldmann H. Replication of Marburg virus in human endothelial cells. A possible mechanism for the development of viral hemorrhagic disease. *J. Clin. Invest.* 1993; 91(4): 1301–9. <https://doi.org/10.1172/JCI116704>
- Hensley L.E., Alves D.A., Geisbert J.B., Fritz E.A., Reed C., Larsen T., et al. Pathogenesis of Marburg hemorrhagic fever

- in cynomolgus macaques. *J. Infect. Dis.* 2011; 204(Suppl. 3): S1021–31. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir339>
30. Shifflett K., Marzi A. Marburg virus pathogenesis – differences and similarities in humans and animal models. *Viol. J.* 2019; 16(1): 165. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1272-z>
 31. Маркин В.А., Борисевич И.В., Махлай А.А. Особенности патогенеза вирусных особо опасных геморрагических лихорадок. В кн.: *Патогенетические основы лечения острых инфекционных заболеваний*. М.: Медицина; 1999: 228–36.
 32. Борисевич И.В., Маркин В.А., Фирсова И.В., Евсеев А.А., Хамитов Р.А., Максимов В.А. Эпидемиология, профилактика, клиника и лечение геморрагических лихорадок (Марбург, Эбола, Ласса и Боливийская). *Вопросы вирусологии*. 2006; 51(5): 8–16.
 33. Mehedi M., Groseth A., Feldmann H., Ebihara H. Clinical aspects of Marburg hemorrhagic fever. *Future Virol.* 2011; 6(9): 1091–106. <https://doi.org/10.2217/fvl.11.79>
 34. Trombley A.R., Wachter L., Garrison J., Buckley-Beason V.A., Jahrling J., Hensley L.E., et al. Comprehensive panel of real-time TaqMan polymerase chain reaction assays for detection and absolute quantification of filoviruses, arenaviruses, and New World hantaviruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2010; 82(5): 954–60. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0636>
 35. Suschak J.J., Schmaljohn C.S. Vaccines against Ebola virus and Marburg virus: Recent advances and promising candidates. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2019; 15(10): 2359–77. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1651140>
 36. Hevey M., Negley D., Zanden L.V., Tammariello R.F., Geisbert J., Schmaljohn C., et al. Marburg virus vaccines: Comparing classical and new approaches. *Vaccine.* 2001; 20(3-4): 586–93. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(01\)00353-X](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(01)00353-X)
 37. Dulin N., Spanier A., Merino K., Hutter J.N., Waterman P.E., Lee C., et al. Systematic review of Marburg virus vaccine nonhuman primate studies and human clinical trials. *Vaccine.* 2021; 39(2): 202–8. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.11.042>
 38. Hevey M., Negley D., Pushko P., Smith J., Schmaljohn A. Marburg virus vaccines based upon alphavirus replicons protect guinea pigs and nonhuman primates. *Virology.* 1998; 251(1): 28–37. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9367>
 39. Daddario-DiCaprio K.M., Geisbert T.W., Geisbert J.B., Stroher U., Hensley L.E., Grolla A., et al. Cross-protection against Marburg virus strains by using a live, attenuated recombinant vaccine. *J. Virol.* 2006; 80(19): 9659–66. <https://doi.org/10.1128/JVI.00959-06>
 40. Marzi A., Menicucci A.R., Engelmann F., Callison J., Horne E.J., Feldmann F., et al. Protection against Marburg virus using a recombinant VSV-vaccine depends on T and B cell activation. *Front. Immunol.* 2019; 9: 3071. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03071>
 41. Woolsey C., Geisbert J.B., Matassov D., Krystle N., Agans V., Borisevich V., et al. Postexposure efficacy of recombinant vesicular stomatitis virus vectors against high and low doses of Marburg virus variant Angola in nonhuman primates. *J. Infect. Dis.* 2018; 218(Suppl. 5): S582–7. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy293>
 42. Mire C.E., Miller A.D., Carville A., Westmoreland S.V., Geisbert J.B., Mansfield K.G., et al. Recombinant vesicular stomatitis virus vaccine vectors expressing filovirus glycoproteins lack neurovirulence in nonhuman primates. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012; 6(3): e1567. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001567>
 43. Warfield K.L., Swenson D.L., Negley D.L., Schmaljohn A.L., Aman M.J., Bavari S. Marburg virus-like particles protect guinea pigs from lethal Marburg virus infection. *Vaccine.* 2004; 22(25-26): 3495–502. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.01.063>
 44. Reynolds P., Marzi A., Reynolds P. Ebola and Marburg virus vaccines. *Virus Genes.* 2017; 53(4): 501–15. <https://doi.org/10.1007/s11262-017-1455-x>
 45. Волкова Н.В., Пьянков О.В., Иванова А.В., Исаева А.А., Зыбкина А.В., Казачинская Е.И. и др. Прототип ДНК-вакцины против вируса Марбурга. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2021; 170(10): 487–91. <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2020-170-10-487-491>
 46. Hargreaves A., Brady C., Mellors J., Tipton T., Miles W., Carroll S.L. Filovirus neutralising antibodies: Mechanisms of action and therapeutic application. *Pathogens.* 2021; 10(9): 1201. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091201>
 47. King L.B., Fusco M.L., Flyak A.I., Ilinykh P.A., Huang K., Gunn B., et al. The marburgvirus-neutralizing human monoclonal antibody MR191 targets a conserved site to block virus receptor binding. *Cell. Host. Microbe.* 2018; 23(1): 101–9.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.12.003>
 48. Brannan J.M., He S., Howell K.A. Post-exposure immunotherapy for two ebolaviruses and Marburg virus in nonhuman primates. *Nat. Commun.* 2019; 10(1): 105. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08040-w>
 49. Geisbert T.W., Daddario-DiCaprio K.M., Geisbert J.B., Young H.A., Formenty P., Fritz E.A., et al. Marburg virus Angola infection of rhesus macaques: Pathogenesis and treatment with recombinant nematode anticoagulant protein c2. *J. Infect. Dis.* 2007; 196(Suppl. 2): S372–81. <https://doi.org/10.1086/520608>
 50. Warren T.K., Warfield K.L., Wells J., Swenson D.L., Donner K.S., Van Tongeren S.A., et al. Advanced antisense therapies for postexposure protection against lethal filovirus infections. *Nat. Med.* 2010; 16(9): 991–4. <https://doi.org/10.1038/nm.2202>
 51. Cross R.W., Bornholdt Z.A., Prasad A.N., Borisevich V., Agans K.N., Deer D.J., et al. Combination therapy protects macaques against advanced Marburg virus disease. *Nat. Commun.* 2021; 12(1): 1891. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22132-0>
 52. Porter D.P., Weidner J.M., Gomba L., Bannister R., Blair C., Jordan R., et al. Remdesivir (GS-5734) is efficacious in Cynomolgus Macaques infected with Marburg virus. *J. Infect. Dis.* 2020; 222(11): 1894–901. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa290>
 53. Jones S.M., Feldmann H., Stroher U., Geisbert J.B., Fernando L., Grolla A., et al. Live attenuated recombinant vaccine protects nonhuman primates against Ebola and Marburg viruses. *Nat. Med.* 2005; 11(7): 786–90. <https://doi.org/10.1038/nm1258>
 54. Lehrer A.T., Chuang E., Namekar M., Williams C.A., Wong T.A.S., Lieberman M., et al. Recombinant protein filovirus vaccines protect Cynomolgus Macaques from Ebola, Sudan, and Marburg viruses. *Front. Immunol.* 2021; 12: 703986. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.703986>
 55. Han Z., Ye H., Liang J., Shepley-McTaggart A., Wrobel J.E., Reitz A.B., et al. Compound FC-10696 inhibits egress of Marburg virus. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2021; 65(7): e0008621. <https://doi.org/10.1128/AAC.00086-21>
 56. Amatya P., Wagner N., Chen G., Luthra P., Shi L., Borek D., et al. Inhibition of Marburg virus RNA synthesis by a synthetic anti-VP35 antibody. *ACS Infect. Dis.* 2019; 5(8): 1385–96. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00091>
 57. Bournazos S., Gupta A., Ravetch J.V. The role of IgG Fc receptors in antibody-dependent enhancement. *Nat. Rev. Immunol.* 2020; 20(10): 633–43. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00410-0>
 58. Trovato M., Sartorius R., D'Apice L., Manco R., De Berardinis P. Viral emerging diseases: Challenges in developing vaccination strategies. *Front. Immunol.* 2020; 11: 2130. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02130>

REFERENCES

- Jacob S.T., Crozier I., Fischer W.A. 2nd, Hewlett A., Kraft C.S., Vega M.A., et al. Ebola virus disease. *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2020; 6(1): 13. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0147-3>
- WHO. Prioritizing diseases for research and development in emergency contexts. Geneva; 2018. Available at: <https://www.who.int/blueprint/priority-diseases/en/>
- O'Brien C., Varty K., Ignaszak A. The electrochemical detection of bioterrorism agents: A review of the detection, diagnostics, and implementation of sensors in biosafety programs for class A bioweapons. *Microsyst. Nanoeng.* 2021; 7: 16. <https://doi.org/10.1038/s41378-021-00242-5>
- Kuhn J.H., Adachi T., Adhikari N.K.J., Arribas J.R., Bah I.E. New filovirus disease classification and nomenclature. *Nat. Rev. Microbiol.* 2019; 17(5): 261–3. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0187-4>
- Brauburger K., Hume A.J., Muhlberger E., Olejnik J. Forty-five years of Marburg virus research. *Viruses*. 2012; 4: 1878–27. <https://doi.org/10.3390/v4101878>
- Carroll S.A., Townner J.S., Sealy T.K. Molecular evolution of viruses of the family Filoviridae based on 97 whole genome sequences. *J. Virol.* 2013; 87(5): 2608–16. <https://doi.org/10.1128/JVI.03118-12>
- Pawęska J.T., Storm N., Markotter W., Paola N.D., Wiley M.R., Palacios G., et al. Shedding of Marburg virus in naturally infected Egyptian Rousette bats, South Africa, 2017. *Emerg. Infect. Dis.* 2020; 26(12): 3051–5. <https://doi.org/10.3201/eid2612.202108>
- Olejnik J., Muhlberger E., Hume A.J. Recent advances in marburgvirus research. *F1000Res*. 2019; 8: F1000 Faculty Rev-704. <https://doi.org/10.12688/f1000research.17573.1>
- Yang X.L., Zhang Y.Z., Jiang R.D. Genetically diverse filoviruses in Rousettus and Eonycteris spp. bats, China, 2009 and 2015. *Emerg. Infect. Dis.* 2017; 23(3): 482–6. <https://doi.org/10.3201/eid2303.161119>
- Porshakov A.M., Kononova Yu.V., Lyong T. Filoviruses of southeast Asia, China and Europe (review). *Zhurnal infek-tologii*. 2019; 11(2): 5–13. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2019-11-2-5-13> (in Russian)
- Ristanović E.S., Kokoškov N.S., Crozier I., Kuhn J.H., Gligić A.S. A forgotten episode of Marburg virus disease: Belgrade, Yugoslavia, 1967. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2020; 84(2): e00095-19. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00095-19>
- Bauer M.P., Timen A., Vossen A.C.T.M., van Disse J.T.I. Marburg haemorrhagic fever in returning travellers: An overview aimed at clinicians. *Clin. Microbiol. Infect.* 2019; 21S: e28-e31. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12673>
- Nyakarahuka L., Shoemaker T.R., Balinandi S., Chemos G., Kwesiga B., Mulei S., et al. Marburg virus disease outbreak in Kween District Uganda, 2017: Epidemiological and laboratory findings. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2019; 13(3): e0007257. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007257>
- WHO. Ghana declares first-ever outbreak of Marburg virus disease; 2022. Available at: <https://www.afro.who.int/countries/ghana/news/ghana-declares-first-ever-outbreak-marburg-virus-disease-0>
- Kortepeter M.G., Dierberg K.D., Shenoy E.S., Cieslak T.J. Marburg virus disease: A summary for clinicians. *Int. J. Infect. Dis.* 2020; 99: 233–42. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.07.042>
- Abir M.H., Rahman T., Das A., Etu S.N., Nafiz I.H., Rakib A., et al. Pathogenicity and virulence of Marburg virus. *Virulence*. 2022; 13(1): 609–33. <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2054760>
- Amman B.R., Schuh A.J., Albariño C.G., Townner J.S. Marburg virus persistence on fruit as a plausible route of bat to primate filovirus transmission. *Viruses*. 2021; 13(12): 2394. <https://doi.org/10.3390/v13122394>
- Coffin K.M., Liu J., Warren T.K., Blancett C.D., Kuehl K.A., Nichols D.K., et al. Persistent Marburg virus infection in the testes of nonhuman primate survivors. *Cell. Host. Microbe*. 2018; 24(3): 405–16.e3. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.08.003>
- Higgs E.S., Gayedyu-Dennis D., Fisher W., Nason M., Reilly C., Beavogui A.H., et al. PREVAIL IV: A randomized, double-blind, two-phase, phase 2 trial of remdesivir versus placebo for reduction of Ebola virus RNA in the semen of male survivors. *Clin. Infect. Dis.* 2021; 73(10): 1849–56. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab215>
- Emanuel J., Marzi A., Feldmann H. Filoviruses: Ecology, molecular biology, and evolution. *Adv. Virus. Res.* 2018; 100: 189221. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2017.12.002>
- Welsch S., Kolesnikova L., Kraehling V., Riches J.D., Becker S., Briggs J.A. Electron tomography reveals the steps in filovirus budding. *PLoS Pathog.* 2010; 6(4): e1000875. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000875>
- Bharat T.A., Riches J.D., Kolesnikova L., Welsch S., Kraehling V., Davey N., et al. Cryo-electron tomography of Marburg virus particles and their morphogenesis within infected cells. *PLoS Biol.* 2011; 9(11): e1001196. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001196>
- Bamberg S., Kolesnikova L., Möller P., Klenk H.D., Becker S. VP24 of Marburg virus influences formation of infectious particles. *J. Virol.* 2005; 79(21): 13421–33. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.21.13421-13433.2005>
- Yaddanapudi K., Palacios G., Townner J.S., Chen I., Sariol C.A., Nichol S.T., et al. Implication of a retrovirus-like glycoprotein peptide in the immunopathogenesis of Ebola and Marburg viruses. *Faseb. J.* 2006; 20: 2519–30. <https://doi.org/10.1096/fj.06-6151.com>
- Amiar S., Husby M.L., Wijesinghe K.J., Angel S., Bhattarai N., Gerstman B.S., et al. Lipid-specific oligomerization of the Marburg virus matrix protein VP40 is regulated by two distinct interfaces for virion assembly. *J. Biol. Chem.* 2021; 296: 100796. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100796>
- Koehler A., Pfeiffer S., Kolesnikova L., Becker S. Analysis of the multifunctionality of Marburg virus VP40. *J. Gen. Virol.* 2018; 99(12): 1614–20. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001169>
- Hume A., Muhlberger E. Marburg virus viral protein 35 inhibits protein kinase R activation in a cell type-specific manner. *J. Infect. Dis.* 2018; 218(Suppl. 5): S403–8. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy473>
- Schnittler H.J., Mahner F., Drenckhahn D., Klenk H.D., Feldmann H. Replication of Marburg virus in human endothelial cells. A possible mechanism for the development of viral hemorrhagic disease. *J. Clin. Invest.* 1993; 91(4): 1301–9. <https://doi.org/10.1172/JCI116704>
- Hensley L.E., Alves D.A., Geisbert J.B., Fritz E.A., Reed C., Larsen T., et al. Pathogenesis of Marburg hemorrhagic fever in cynomolgus macaques. *J. Infect. Dis.* 2011; 204(Suppl. 3): S1021–31. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir339>
- Shifflett K., Marzi A. Marburg virus pathogenesis – differences and similarities in humans and animal models. *Virol. J.* 2019; 16(1): 165. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1272-z>
- Markin V.A., Borisevich I.V., Makhlay A.A. Features of the pathogenesis of viral especially dangerous hemorrhagic fevers. In: *Pathogenetic Bases of Treatment of Acute Infectious Diseases [Patogeneticheskie osnovy lecheniya ostrykh infektsionnykh zabolevaniy]*. Moscow: Meditsina; 1999: 228–36. (in Russian)
- Borisevich I.V., Markin V.A., Firsova I.V., Evseev A.A., Khamitov R.A., Maksimov V.A. Hemorrhagic (Marburg, Ebola, Lassa, and Bolivian) fevers: epidemiology, clinical pictures, and treatment. *Voprosy virusologii*. 2006; 51(5): 8–16. (in Russian)
- Mehedi M., Groseth A., Feldmann H., Ebihara H. Clinical aspects of Marburg hemorrhagic fever. *Future Virol.* 2011; 6(9): 1091–106. <https://doi.org/10.2217/fvl.11.79>

34. Trombley A.R., Wachter L., Garrison J., Buckley-Beason V.A., Jahrling J., Hensley L.E., et al. Comprehensive panel of real-time TaqMan polymerase chain reaction assays for detection and absolute quantification of filoviruses, arenaviruses, and New World hantaviruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2010; 82(5): 954–60. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0636>
35. Suschak J.J., Schmaljohn C.S. Vaccines against Ebola virus and Marburg virus: Recent advances and promising candidates. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2019; 15(10): 2359–77. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1651140>
36. Hevey M., Negley D., Zanden L.V., Tammariello R.F., Geisbert J., Schmaljohn C., et al. Marburg virus vaccines: Comparing classical and new approaches. *Vaccine.* 2001; 20(3-4): 586–93. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(01\)00353-X](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(01)00353-X)
37. Dulin N., Spanier A., Merino K., Hutter J.N., Waterman P.E., Lee C., et al. Systematic review of Marburg virus vaccine nonhuman primate studies and human clinical trials. *Vaccine.* 2021; 39(2): 202–8. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.11.042>
38. Hevey M., Negley D., Pushko P., Smith J., Schmaljohn A. Marburg virus vaccines based upon alphavirus replicons protect guinea pigs and nonhuman primates. *Virology.* 1998; 251(1): 28–37. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9367>
39. Daddario-DiCaprio K.M., Geisbert T.W., Geisbert J.B., Stroher U., Hensley L.E., Grolla A., et al. Cross-protection against Marburg virus strains by using a live, attenuated recombinant vaccine. *J. Virol.* 2006; 80(19): 9659–66. <https://doi.org/10.1128/JVI.00959-06>
40. Marzi A., Menicucci A.R., Engelmann F., Callison J., Horne E.J., Feldmann F., et al. Protection against Marburg virus using a recombinant VSV-vaccine depends on T and B cell activation. *Front. Immunol.* 2019; 9: 3071. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03071>
41. Woolsey C., Geisbert J.B., Matassov D., Krystle N., Agans V., Borisevich V., et al. Postexposure efficacy of recombinant vesicular stomatitis virus vectors against high and low doses of Marburg virus variant Angola in nonhuman primates. *J. Infect. Dis.* 2018; 218(Suppl. 5): S582–7. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy293>
42. Mire C.E., Miller A.D., Carville A., Westmoreland S.V., Geisbert J.B., Mansfield K.G., et al. Recombinant vesicular stomatitis virus vaccine vectors expressing filovirus glycoproteins lack neurovirulence in nonhuman primates. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012; 6(3): e1567. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001567>
43. Warfield K.L., Swenson D.L., Negley D.L., Schmaljohn A.L., Aman M.J., Bavari S. Marburg virus-like particles protect guinea pigs from lethal Marburg virus infection. *Vaccine.* 2004; 22(25-26): 3495–502. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.01.063>
44. Reynolds P., Marzi A., Reynolds P. Ebola and Marburg virus vaccines. *Virus Genes.* 2017; 53(4): 501–15. <https://doi.org/10.1007/s11262-017-1455-x>
45. Volkova N.V., P'yankov O.V., Ivanova A.V., Isaeva A.A., Zybki-na A.V., Kazachinskaya E.I., et al. Prototype of a DNA vaccine against Marburg virus. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny.* 2021; 170(10): 487–91. <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2020-170-10-487-491> (in Russian)
46. Hargreaves A., Brady C., Mellors J., Tipton T., Miles W., Carroll S.L. Filovirus neutralising antibodies: Mechanisms of action and therapeutic application. *Pathogens.* 2021; 10(9): 1201. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091201>
47. King L.B., Fusco M.L., Flyak A.I., Ilinykh P.A., Huang K., Gunn B., et al. The marburgvirus-neutralizing human monoclonal antibody MR191 targets a conserved site to block virus receptor binding. *Cell. Host. Microbe.* 2018; 23(1): 101–9.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.12.003>
48. Brannan J.M., He S., Howell K.A. Post-exposure immunotherapy for two ebolaviruses and Marburg virus in nonhuman primates. *Nat. Commun.* 2019; 10(1): 105. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08040-w>
49. Geisbert T.W., Daddario-DiCaprio K.M., Geisbert J.B., Young H.A., Formenty P., Fritz E.A., et al. Marburg virus Angola infection of rhesus macaques: Pathogenesis and treatment with recombinant nematode anticoagulant protein c2. *J. Infect. Dis.* 2007; 196(Suppl. 2): S372–81. <https://doi.org/10.1086/520608>
50. Warren T.K., Warfield K.L., Wells J., Swenson D.L., Donner K.S., Van Tongeren S.A., et al. Advanced antisense therapies for postexposure protection against lethal filovirus infections. *Nat. Med.* 2010; 16(9): 991–4. <https://doi.org/10.1038/nm.2202>
51. Cross R.W., Bornholdt Z.A., Prasad A.N., Borisevich V., Agans K.N., Deer D.J., et al. Combination therapy protects macaques against advanced Marburg virus disease. *Nat. Commun.* 2021; 12(1): 1891. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22132-0>
52. Porter D.P., Weidner J.M., Gomba L., Bannister R., Blair C., Jordan R., et al. Remdesivir (GS-5734) is efficacious in Cynomolgus Macaques infected with Marburg virus. *J. Infect. Dis.* 2020; 222(11): 1894–901. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa290>
53. Jones S.M., Feldmann H., Stroher U., Geisbert J.B., Fernando L., Grolla A., et al. Live attenuated recombinant vaccine protects nonhuman primates against Ebola and Marburg viruses. *Nat. Med.* 2005; 11(7): 786–90. <https://doi.org/10.1038/nm1258>
54. Lehrer A.T., Chuang E., Namekar M., Williams C.A., Wong T.A.S., Lieberman M., et al. Recombinant protein filovirus vaccines protect Cynomolgus Macaques from Ebola, Sudan, and Marburg viruses. *Front. Immunol.* 2021; 12: 703986. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.703986>
55. Han Z., Ye H., Liang J., Shepley-McTaggart A., Wrobel J.E., Reitz A.B., et al. Compound FC-10696 inhibits egress of Marburg virus. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2021; 65(7): e0008621. <https://doi.org/10.1128/AAC.00086-21>
56. Amatya P., Wagner N., Chen G., Luthra P., Shi L., Borek D., et al. Inhibition of Marburg virus RNA synthesis by a synthetic anti-VP35 antibody. *ACS Infect. Dis.* 2019; 5(8): 1385–96. <https://doi.org/10.1021/acscinfecdis.9b00091>
57. Bournazos S., Gupta A., Ravetch J.V. The role of IgG Fc receptors in antibody-dependent enhancement. *Nat. Rev. Immunol.* 2020; 20(10): 633–43. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00410-0>
58. Trovato M., Sartorius R., D'Apice L., Manco R., De Bernardinis P. Viral emerging diseases: Challenges in developing vaccination strategies. *Front. Immunol.* 2020; 11: 2130. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02130>

Информация об авторе

Маркин Владимир Александрович[✉] — д.м.н., с.н.с., в.н.с. 48 ЦНИИ МО РФ, Сергиев Посад-6, Россия, vamarkin72@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5996-3985>

Статья поступила в редакцию 28.07.2022;
принята к публикации 28.09.2022;
опубликована 30.10.2022

Information about the author

Vladimir A. Markin[✉] — D. Sci. (Med.), senior researcher, leading researcher, 48 Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Posad, Russia, vamarkin72@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5996-3985>

The article was submitted 28.07.2022;
accepted for publication 28.09.2022;
published 30.10.2022