

6

НОЯБРЬ — ДЕКАБРЬ

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

6

NOVEMBER — DECEMBER

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).

6

НОЯБРЬ – ДЕКАБРЬ

**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 30.12.2022.

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., академик РАН, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии,
иммунологии, Первый Московский государственный медицинский университет
им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Заместитель главного редактора

Семенов Т.А., д.м.н., проф., руководитель отдела эпидемиологии ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии
имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

Ответственный секретарь

Платонов А.Е., д.м.н., проф., главный научный сотрудник лабораторией эпидемиологии природно-очаговых
инфекций, ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Российские члены редакционной коллегии

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

Брико Н.И., д.м.н., проф., академик РАН, директор Института
общественного здоровья, зав. кафедрой эпидемиологии
и доказательной медицины, Первый Московский
государственный медицинский университет
им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва

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

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

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

Горелов А.В., д.м.н., проф., академик 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. Иванова, ФНИЦ эпидемиологии и микробио-
логии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи
Минздрава России, Москва

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

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

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

Иностранные члены редакционной коллегии

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

Shubhada 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 им. М.П. Чумакова» РАН, Москва,
Россия

Кюрегян 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., академик 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., академик 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., академик 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)

6

NOVEMBER–DECEMBER

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>.

FOUNDERS:

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

PUBLISHER:

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

EDITORIAL OFFICE:

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

Head of the Editorial and publishing department:

Olga V. Osokina

Head of Editorial Office:

Olga V. Ustinkova

The Editorial Board is not responsible for the advertising content.

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

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

Signed to the press on December 30, 2022. Print format 60×90¹/₈. Circulation 280 copies.

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

© Central Research Institute for Epidemiology, 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

Давыдов В.В., Жаворонок С.В., Зновец Т.В., Цыркунов В.М., Бабенко А.С., Марчук С.И., Гасич Е.Л., Новик Т.П., Алаторцева Г.И., Михайлов М.И., Зверев В.В. Молекулярно-эпидемиологическое исследование случаев острого гепатита Е в Беларуси	625
Останкова Ю.В., Серикова Е.Н., Семенов А.В., Зуева Е.Б., Валутите Д.Э., Щемелев А.Н., Зурочка В.А., Тоголян А.А. Молекулярно-генетическая характеристика полноразмерного генома вируса гепатита В у HBsAg-негативных доноров крови в Уральском федеральном округе*	637
Афонина Н.М., Михеева И.В. Влияние вакцинопрофилактики на заболеваемость ветряной оспой в России*	651
Каплина О.Н., Гамалей С.Г., Иванова О.С., Даниленко Е.Д. Двуспиральные РНК — перспективные адъюванты для повышения иммуногенности вакцин.....	661
Синягина М.Н., Лайков А.В., Маркелова М.И., Булыгина Е.А., Хуснутдинова Д.Р., Абдулхаков С.Р., Григорьева Т.В. Физиолого-биохимическая и генетическая характеристика конкурентных свойств штаммов <i>Escherichia coli</i> в кишечной микрофлоре пациентов с болезнью Крона и здоровых добровольцев.....	669
Заднова С.П., Плеханов Н.А., Спирина А.Ю., Крицкий А.А. Сравнительный анализ структуры и экспрессии регуляторного гена <i>vasH</i> системы секреции 6-го типа токсигенных и нетоксигенных штаммов <i>Vibrio cholerae</i>	682
Сварваль А.В., Старкова Д.А., Ферман Р.С. Детерминанты вирулентности и генотипы клинических изолятов <i>Helicobacter pylori</i>	692
Постникова О.Н., Шеекопляс Л.А., Кувееда Т.А., Сатаева Т.П., Кирсанова М.А., Логадырь Т.А. Влияние эфирного масла чабера горного на рост культур условно-патогенных микроорганизмов	701
ОБЗОРЫ	
Булгакова И.Д., Севитич О.А., Зверев В.В. Механизмы формирования толерантности Toll-подобных рецепторов под действием микробных лигандов*	708
Топол И.А., Полякова И.С., Елыкова А.В. Роль кишечной микробиоты в регуляции иммунных реакций в иммунной системе кишечника в условиях стресса и при модуляции её состава путём введения антибиотиков и пробиотиков	722
ХРОНИКА	
Резолюция XII Съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (Москва, 26–28 октября 2022 г.)	734

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

CONTENTS

ORIGINAL RESEARCHES

Davydov V.V., Zhavoronok S.V., Znovets T.V., Tsyrkunov V.M., Babenka A.S., Marchuk S.I., Gasich E.L., Novik T.P., Alatorseva G.I., Mikhailov M.I., Zverev V.V. Molecular epidemiological study of clinical cases of acute hepatitis E in Belarus	625
Ostankova Yu.V., Serikova E.N., Semenov A.V., Zueva E.B., Valutite D.E., Schemelev A.N., Zurochka V.A., Totolian A.A. Molecular and genetic characterization of the hepatitis B virus full-length genome sequences identified in HBsAg-negative blood donors in Ural Federal District*	637
Afonina N.M., Mikheeva I.V. The effect of preventive vaccination on chickenpox incidence in Russia*	651
Kaplina O.N., Gamaley S.G., Ivanova O.S., Danilenko E.D. Double-stranded RNAs are promising adjuvants for enhancing immunogenicity of vaccines	661
Siniagina M.N., Laikov A.V., Markelova M.I., Boulygina E.A., Khusnutdinova D.R., Abdulkhakov S.R., Grigoryeva T.V. Competitive ability of <i>Escherichia coli</i> strains in the intestinal microbiota of patients with Crohn's disease and healthy volunteers: physiological, biochemical and genetic characteristics	669
Zadnova S.P., Plekhanov N.A., Spirina A.Yu., Kritskiy A.A. Comparative analysis of the structure and expression of the <i>vasH</i> regulatory gene of type VI secretion system in toxigenic and non-toxigenic <i>Vibrio cholerae</i> strains	682
Svarval A.V., Starkova D.A., Ferman R.S. Determinants of virulence and genotypes of clinical isolates <i>Helicobacter pylori</i>	692
Postnikova O.N., Shevkoplyas L.A., Kuevda T.A., Sataeva T.P., Kirsanova M.A., Logadyr T.A. Effect of the essential oil of <i>Satureja montana</i> L. on the growth of cultures of conditionally pathogenic microorganisms	701
REVIEWS	
Bulgakova I.D., Svitich O.A., Zverev V.V. Mechanisms of Toll-like receptor tolerance induced by microbial ligands*	708
Topol I.A., Polyakova I.S., Elykova A.V. Role of intestinal microbiota in regulation of immune reactions of gut-associated lymphoid tissue under stress and following the modulation of its composition by antibiotics and probiotics administration	722
CHRONICLE	
Resolution of the XII Congress of the All-Russian Scientific and Practical Society of Epidemiologists, microbiologists and parasitologists (Moscow, October 26–28, 2022)	734

* 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/10.36233/0372-9311-328>



Молекулярно-эпидемиологическое исследование случаев острого гепатита E в Беларуси

Давыдов В.В.^{1✉}, Жаворонок С.В.¹, Зновец Т.В.², Цыркунов В.М.³, Бабенко А.С.¹, Марчук С.И.¹, Гасич Е.Л.⁴, Новик Т.П.¹, Алаторцева Г.И.⁵, Михайлов М.И.^{5,6}, Зверев В.В.^{5,7}

¹Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь;

²Третья городская клиническая больница имени Е.В. Клумова, Минск, Республика Беларусь;

³Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Республика Беларусь;

⁴Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Республика Беларусь;

⁵Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

⁶Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия;

⁷Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Аннотация

Актуальность. Частота встречаемости анamnестических антител к вирусу гепатита E (ВГЕ) в общей популяции условно здорового населения Республики Беларусь составляет 7,3%, что явно не согласуется с низкими показателями заболеваемости гепатитом E (ГЕ). Большинство первичных случаев ГЕ остаются недиагностированными. Интенсивный эпидемический процесс ГЕ в белорусской популяции носит скрытый характер. Проведение эпидемиологических исследований, включающих генотипирование последовательностей ВГЕ, выделенных на территории Беларуси, позволяют более точно характеризовать источники возбудителей ГЕ и механизмы их передачи.

Цель — молекулярно-эпидемиологическое исследование 2 случаев острого ГЕ, выявленных у пациентов из Беларуси.

Материалы и методы. В 2021–2022 гг. были получены образцы биологического материала от 2 пациентов, проходящих лечение с установленным диагнозом острого ГЕ. Образцы сыворотки крови использовали для обнаружения антител к ВГЕ при помощи иммуноферментного анализа, РНК ВГЕ выявляли из образцов фекалий при помощи метода гнездовой полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой. Нуклеотидную последовательность определяли на автоматическом секвенаторе по методу Сенгера. Анализ нуклеотидных последовательностей, их генотипирование и расчёт эволюционных расстояний выполняли с помощью программного обеспечения «MEGA X».

Результаты. Последовательность РНК ВГЕ, выделенная из организма беременной, имеющей в эпидемиологическом анамнезе эпизод алиментарного контакта с сырым свиным фаршем, кластеризуется в общую филогенетическую ветвь с последовательностью, полученной из организма пациента из Беларуси, имеющего в анамнезе трансплантацию почки, и последовательностями, выделенными из организма домашней свиньи. Последовательность РНК ВГЕ, выделенная из организма пациента, имеющего в анамнезе эпизод выезда в Пакистан, относится к первому генотипу ВГЕ и кластеризуется в общую филогенетическую ветвь с последовательностями ВГЕ, выделенными в Пакистане, Индии, Непале и Монголии.

Ключевые слова: гепатит E, филогенетический анализ, нуклеотидные последовательности вируса гепатита E, молекулярная эпидемиология

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Комитетом по биомедицинской этике Белорусского государственного медицинского университета (протокол № 8 от 26.04.2016).

Источники финансирования. Исследование выполнено в рамках Межгосударственной программы инновационного сотрудничества государств — участников СНГ на период до 2020 года при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (уникальный идентификатор проекта RFMEF161319X0091) и ГКНТ РБ.

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

Для цитирования: Давыдов В.В., Жаворонок С.В., Зновец Т.В., Цыркунов В.М., Бабенко А.С., Марчук С.И., Гасич Е.Л., Новик Т.П., Алаторцева Г.И., Михайлов М.И., Зверев В.В. Молекулярно-эпидемиологическое исследование случаев острого гепатита E в Беларуси. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2022;99(6):625–636.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-328>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-328>

Molecular epidemiological study of clinical cases of acute hepatitis E in Belarus

Vladimir V. Davydov¹✉, Sergey V. Zhavoronok¹, Tatyana V. Znovets², Vladimir M. Tsyrcunov³, Andrei S. Babenka¹, Svetlana I. Marchuk¹, Elena L. Gasich⁴, Tatiana P. Novik¹, Galina I. Alatortseva², Michael I. Mikhailov^{5,6}, Vitaly V. Zverev^{5,7}

¹Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus;

²Third City Clinical Hospital named after E.V. Klumov, Minsk, Belarus;

³Grodno State Medical University, Grodno, Belarus;

⁴Republican Scientific and Practical Center of Epidemiology and Microbiology, Minsk;

⁵I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia;

⁶Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia;

⁷I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Abstract

Relevance. The frequency of occurrence of anamnestic antibodies to the hepatitis E virus (HEV) in the general population of the Republic of Belarus is 7.3%, which is clearly not consistent with the low incidence of hepatitis E (HE). Most of primary HEV infections remain undiagnosed. The intensive epidemic process of HEV in the Belarusian population is hidden. Conducting epidemiological studies, including genotyping of HEV sequences isolated on the territory of the republic, makes it possible to more accurately characterize the sources of HEV infection and the mechanisms of its transmission.

Aim — molecular epidemiological study of two cases of acute hepatitis E detected in patients from Belarus.

Materials and methods. During 2021–2022, samples of biological material were obtained from two patients undergoing treatment with an established diagnosis of acute hepatitis E. Serum samples were tested to detect antibodies to HEV using enzyme immunoassay, HEV RNA was detected in fecal samples using nested RT-PCR. The nucleotide sequence was determined by an automatic sequencer using the Sanger method. Analysis of nucleotide sequences, their genotyping, and calculation of evolutionary distances were performed using MEGA X software.

Results. The HEV sequence isolated from a pregnant woman who had an epidemiological episode of alimentary contact with raw pork meat is clustered into a common phylogenetic clade with HEV sequence obtained from the patient from Belarus with a history of kidney transplantation and HEV sequences isolated from a domestic pigs. The HEV sequence isolated from a patient with a history of travel to Pakistan belongs to the HEV genotype 1 and joins a clade of HEV sequences isolated in Pakistan, India, Nepal and Mongolia.

Keywords: hepatitis E, phylogenetic analysis, nucleotide sequences of hepatitis E virus, molecular epidemiology

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Biomedical Ethics Committee of the Belarusian State Medical University (protocol No. 8, April 26, 2016).

Funding source. The research was carried out as part of the Interstate program of innovation cooperation of States — participants of the CIS up to 2020, with the financial support of the Ministry of education and science of the Russian Federation, the project ID RFMEFI61316X0091, and the State Committee for Science and Technology of the Republic of Belarus.

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

For citation: Davydov V.V., Zhavoronok S.V., Znovets T.V., Tsyrcunov V.M., Babenka A.S., Marchuk S.I., Gasich E.L., Novik T.P., Alatortseva G.I., Mikhailov M.I., Zverev V.V. Molecular epidemiological study of clinical cases of acute hepatitis E in Belarus. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(6):625–636.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-328>

Введение

Вирус гепатита E (ВГЕ) (*Paslahepevirus balayani*), названный в честь первооткрывателя вируса — советского вирусолога М.С. Балаяна [1], относится к семейству *Hepeviridae* рода *Paslahepevirus*. Префикс «*Pasla*» является аббревиатурой и происходит от первых букв латинских на-

званий таксонов известных хозяев вируса: *Primates*, *Artiodactyla*, *Scandentia*, *Lagomorpha* [2]. Корень «*hepe*» в родовом названии показывает тропность вируса, который в основном способен к репликации в клетках печени. Это РНК-содержащий вирус, вызывающий острый вирусный гепатит у человека. На основе филогенетического анализа выделя-

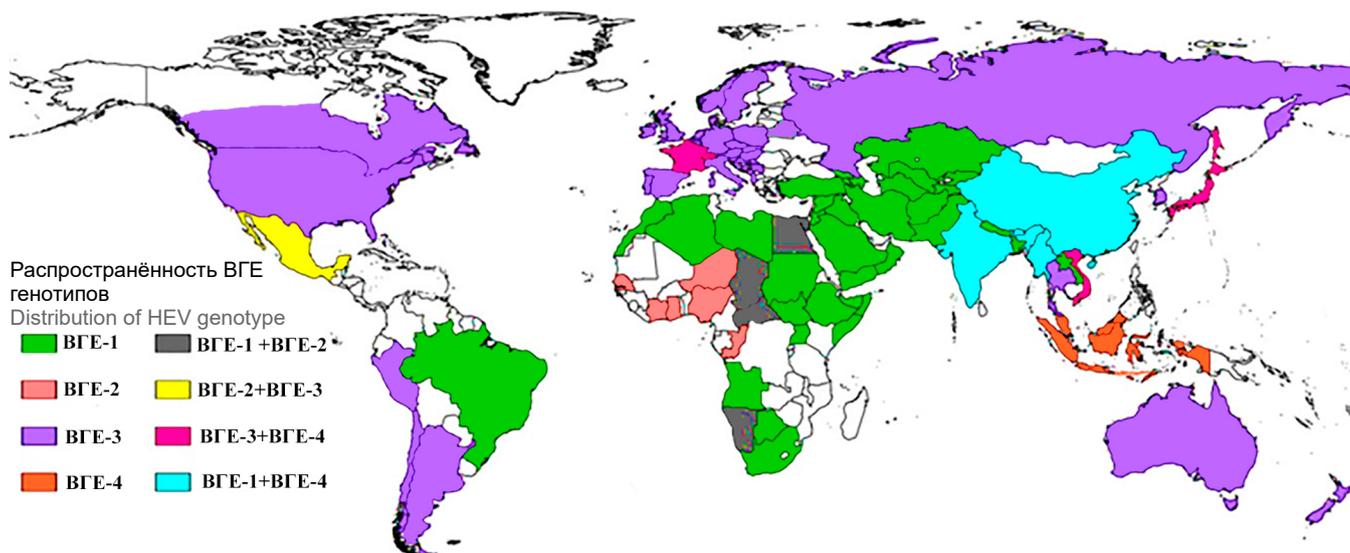


Рис. 1. Глобальное распределение основных генотипов ВГЕ.

Различные цвета на карте указывают на распределение генотипов ВГЕ (ВГЕ-1–ВГЕ-4) по всему миру [4].

Fig. 1. Global distribution of major HEV genotypes.

The different colors on the map indicate the distribution of HEV genotypes (HEV-1 to HEV-4) around the world [4].

ют 8 генотипов вируса (ВГЕ-1–ВГЕ-8). Известно, что только 5 генотипов ВГЕ из 8 известных могут инфицировать человека. Генотипы 1 и 2 имеют фекально-оральный механизм передачи и вызывают крупные вспышки заболеваний в развивающихся странах. Генотипы ВГЕ-3 и ВГЕ-4 вызывают зоонозную инфекцию, передающуюся человеку от заражённых животных: свиней, оленей и диких кабанов. Передача обычно происходит при употреблении в пищу сырого или недостаточно термически обработанного мяса или печени этих животных. ВГЕ-5 и ВГЕ-6 до сих пор были обнаружены только у диких кабанов в Японии. ВГЕ-7 и ВГЕ-8 недавно были найдены у верблюдов на Ближнем Востоке и в Китае. Из этих 4 генотипов было описано только одно заражение человека ВГЕ-7, связанное с употреблением заражённого верблюжьего мяса и молока [3] пациентом с ослабленным иммунитетом после трансплантации. В странах Европы наиболее часто гепатит Е (ГЕ) вызывается генотипом ВГЕ-3. Глобальная распространённость доминирующих генотипов ВГЕ представлена на **рис. 1**.

ВГЕ является гепатотропным инфекционным агентом, который обычно вызывает самокупирующийся острый гепатит у здоровых взрослых и может вызывать хронический гепатит у лиц с ослабленным иммунитетом [5]. По оценкам ВОЗ, ежегодно происходит более 20 млн случаев инфицирования, что приводит примерно к 3 млн симптоматических случаев ГЕ и около 70 000 смертей, связанных с ним¹. Истинное глобальное бремя данного

заболевания, вероятно, является ещё большим [6]. Исследования распространённости антител к ВГЕ у здоровых людей, проведённые в различных странах, показывают, что до половины населения может иметь анamnестические антитела против ВГЕ [7]. Однако у беременных женщин острый ГЕ может быть очень тяжёлым и приводить в 30% случаев к летальному исходу в случае заражения в III триместре [8]. Кроме того, инфицирование ВГЕ во время беременности часто приводит к преждевременным родам, вертикальной передаче, значительной перинатальной заболеваемости и мертворождениям [9]. Эта проблема осложняется невозможностью применения рибавирина и интерферона I типа из-за риска тератогенного действия, поэтому беременным женщинам с ГЕ обычно назначается только поддерживающая терапия [10].

Механизмы тяжёлого поражения печени при инфицировании ВГЕ у беременных точно неизвестны. Развитие фульминантного гепатита может быть обусловлено изменённым иммунитетом, высоким уровнем гормонов и факторами, связанными с самим вирусом. Факторы, связанные с вирусом, включают варианты генотипа ВГЕ и его белки, например малый многофункциональный белок, кодируемый третьей открытой рамкой считывания вирусного генома. Иммуные факторы организма-хозяина, такие как CD8⁺-T-, NK- и NKT-клетки, могут быть вовлечены в патогенез ГЕ во время беременности. Кроме того, в этот процесс могут быть вовлечены некоторые цитокины, такие как фактор некроза опухоли- α , интерлейкин-6, интерферон- γ и трансформирующий фактор роста- β 1. Резко повышенные уровни гормонов, включая прогестерон, эстроген и

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

хорионический гонадотропин, во время беременности также могут способствовать повреждению печени [11]. Кроме того, частый неблагоприятный исход ГЕ у беременных, вероятно, связан с возможностью репликации ВГЕ в мезенхимальных стромальных клетках эндометрия [12].

ВГЕ представляет собой РНК-содержащий вирус с капсидом с икосаэдрической структурой размером 27–34 нм. ВГЕ существует в виде квазиоболочечных вирусных частиц в крови и супернатанте клеточных культур и в виде безоболочечных вирионов в желчи и фекалиях [13]. Инфицирование организма-хозяина происходит алиментарно через заражённую пищу или воду. При попадании в желудочно-кишечный тракт вирионы сначала инфицируют энтероциты, где они размножаются, выделяются в виде квазиоболочечных вирусных частиц в кровоток и инфицируют гепатоциты [14]. При выходе из гепатоцитов в результате контакта с желчью оболочка «срывается», вирус обнажается и более контагиозные вирионы снова выделяются через фекалии.

Геном ВГЕ имеет размер 7,2 kb и представляет собой одноцепочечную смысловую РНК, содержащую в большинстве случаев 3 открытые рамки считывания (ОРС) [15]. ОРС1 обеспечивает синтез неструктурного полипротеина, необходимого для репликации вируса. ОРС2 образует субгеномную бицистронную РНК размером 2,2 kb и кодирует белок (pORF2), состоящий из 660 а.о. Белок pORF2 процессируется в три формы: две из них секретируются из поражённой клетки в виде гликопротеинов, которые не связаны с инфекционными частицами, и третья, негликозилированную форму, которая является структурным компонентом инфекционных частиц [16]. ОРС3 является наименьшей из трех и перекрывается с ОРС2 примерно на 300 нуклеотидов в альтернативной рамке считывания [17]. Существует также ОРС4, перекрывающаяся с ОРС1, она присутствует только в геноме ВГЕ-1 [18]. ОРС4 кодирует белок (pORF4) из 124 а.о., который усиливает активность вирусной полимеразы, способствует репликации вируса и необходим для жизненного цикла ВГЕ-1. Вероятно данная особенность определяет эпидемический характер распространения ВГЕ 1-го генотипа.

Процесс систематики генетического разнообразия ВГЕ имеет ряд трудностей. В нашей работе мы придерживались подходов, описанных D.V. Smith и соавт. [19]. Систематика субгенотипов ВГЕ основана на изучении различий эволюционного расстояния (p-distance) последовательностей генома вируса и их филогенетического положения. Эволюционные расстояния нуклеотидных последовательностей среди полных геномных последовательностей ВГЕ-1 формируют непрерывное распределение до 0,122. Расстояния внутри субгенотипов колеблются до 0,06, перекрывая диапазон

субгенотиповых расстояний ($> 0,037$), включая расстояния 0,056–0,064 между субгенотипами 1b и 1c и 0,044–0,082 между субгенотипами 1a и 1f. Перекрытие диапазонов меж- и внутрисубгенотиповых сравнений является ещё более выраженным для расстояний, рассчитанных для аминокислотных последовательностей. Систематика субгенотипов ВГЕ-3 демонстрирует ещё более сложный паттерн с формированием разных филогенетических групп. Так, субгенотипы 3a, 3b, 3c, 3h, 3i и 3j и субгенотипы 3e, 3f и 3g образуют две главные филогенетические клады 3abchij и 3efg. Третью кладу формируют субгенотипы кроличьего ВГЕ-3.

Целью настоящего исследования явилось молекулярно-эпидемиологическое исследование двух случаев острого ГЕ, выявленных у пациентов из Беларуси.

Материалы и методы

В 2021–2022 гг. были получены образцы биологического материала от двух пациентов, проходящих лечение в учреждениях здравоохранения Республики Беларусь, с установленным диагнозом острого ГЕ. Предварительно пациенты дали добровольное информированное согласие для участия в исследовании. Протокол исследования одобрен Комитетом по биомедицинской этике Белорусского государственного медицинского университета (протокол № 8 от 26.04.2016).

Полученные образцы тестировали на присутствие специфических иммуноглобулинов классов М (анти-ВГЕ IgM) и G (анти-ВГЕ IgG) при помощи иммуноферментного анализа и на присутствие РНК ВГЕ при помощи ПЦР-анализа. Анти-ВГЕ IgG и анти-ВГЕ IgM определяли с использованием наборов реагентов «ДС-ИФА-АНТИ-НЕV-G» и «ДС-ИФА-АНТИ-НЕV-M» (НПО «Диагностические системы») согласно инструкциям производителя. Использовали также разработанные нами новые тест-системы для выявления анти-ВГЕ IgG и анти-ВГЕ IgM в сыворотке крови, основанные на непрямом варианте иммуноферментного анализа [20] и применении в качестве антигенов рекомбинантных белков ORF2 и ORF3 ВГЕ-3, предоставленных НИИВС им. И.И. Мечникова [21]. Все положительные результаты, полученные при помощи тест-систем, являющихся нашей разработкой, были верифицированы повторным исследованием образцов в тест-системах сравнения производства НПО «Диагностические системы».

Набор для выделения нуклеиновых кислот («Jena Bioscience») использовали в соответствии с протоколом производителя для выделения тотальной РНК. Для выявления РНК ВГЕ применяли адаптированный нами метод с вырожденными праймерами, ориентированными на участок ОРС2 генома ВГЕ с 5905 по 6635 нт. Условия проведения

ОТ-ПЦР соответствовали описанным ранее [22]. Подтверждение положительных результатов проводили коммерческим набором «HEV RT-PCR Kit 2.0» («RealStar[®]», «Altona»).

Набор «QIAquick Gel Extraction Kit» («QIAGEN») использовали для экстрагирования из агарозы продуктов амплификации, содержащихся в геле. Нуклеотидную последовательность фрагмента генома ВГЕ определяли в ходе прямого секвенирования ампликонов на автоматическом секвенаторе «3500 GeneticAnalyzer» («ABI») с использованием набора «BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit» («Thermo Scientific»).

Анализ нуклеотидных последовательностей ВГЕ, их генотипирование и расчёт эволюционных расстояний выполняли с помощью программного обеспечения «MEGA X» [23]. В анализ были включены 59 нуклеотидных последовательностей, являющихся фрагментами ORC2 ВГЕ величиной 273 нуклеотида (нуклеотидные позиции 6193–6466 относительно штамма Burma, номер в GenBank M73218), 11 последовательностей, выделенных из биологического материала человека и животных в Республике Беларусь, 40 референсных последовательностей для 1–8 генотипов и субгенотипов ВГЕ, предложенных D.V. Smith и соавт. [19], а также 8 наиболее близких по результатам BLAST-анализа последовательностей к выделенным в Беларуси. Последовательность птичьего ВГЕ была включена как внешняя группа для отрицательного контроля. Филогенетический анализ был проведён методом максимального правдоподобия и модели Хасегава–Кишино–Яно [24].

Результаты

Клинический случай 1

Женщина, 33 года (код на дендрограмме Patient_Cx_BY_2021|g3), поступила в отделение патологии беременности 22.02.2021. Диагноз при поступлении: «Беременность 38–39 нед. Хроническая гипоксия плода, компенсация. Краевое приращение пуповины». В течение последнего месяца пациентка отмечала появление кожного зуда стоп, ладоней и живота, усиливающегося к вечеру. Зуд усилился с 15.02.2021. В общем анализе мочи билирубин — 10 мкмоль/л. УЗИ органов брюшной полости — гепатомегалия. Результаты биохимического исследования крови: прямой билирубин — 5,23 мкмоль/л, аланинаминотрансфераза (АЛТ) — 289,7 ЕД/л, аспартатаминотрансфераза (АСТ) — 306,8 ЕД/л, γ -глутамилтранспептидаза (ГГТП) — 53,1 ЕД/л. Маркеры вирусов гепатита А, В и С не выявлены. Тест на анти-ВГЕ IgM — положительный, на анти-ВГЕ IgG — отрицательный.

Эпидемиологический анамнез: проживает в городской квартире, сырокопчёные и кровяные кол-

басы в домашних условиях не готовит, свинину, выращенную на собственном подворье, приобретает у родителей. Воду употребляет из централизованного водопровода. В течение последнего года за пределы Беларуси не выезжала. Переливание компонентов крови и парентеральные манипуляции не проводились. Гепатитом не болела, контакта с желтушными больными не было. Примерно за месяц до госпитализации готовила котлеты из фарша домашней вьетнамской свинины и свиного фарша в соотношении 1 : 1. Во время приготовления котлет пробовала на вкус сырой фарш.

В сроке гестации 280 дней произошли срочные быстрые роды. Родился живой доношенный мальчик с оценкой по шкале Апгар 8/9 баллов. Выписана домой с ребёнком на 10-е сутки после родов.

Клинический случай 2

Мужчина, 28 лет (код на дендрограмме Patient_Sh_BY_2022|g1), поступил в стационар 07.04.2022. Заболел 04.04.2022, когда на фоне утомляемости проявились желтушная окраска кожи, тёмная моча и «светлый» стул. Результаты лабораторного обследования: билирубин общий — 111,8 мкмоль/л, АЛТ — 1532 ЕД/л, АСТ — 2223 ЕД/л, щелочная фосфатаза — 275 ЕД/л, ГГТП — 347 ЕД/л. При ультразвуковом обследовании органов брюшной полости выявлена гепатомегалия. Маркеры вирусов гепатита А, В и С не выявлены. Тест на анти-ВГЕ IgM — положительный, на анти-ВГЕ IgG — положительный.

Эпидемиологический анамнез: в последнее время проживает в Гродно, является уроженцем Пакистана. За последние 6 мес выезжал за пределы Беларуси в Италию и Пакистан, вернулся из Пакистана за 2 нед до начала клинических проявлений заболевания.

Диагноз: острый ГЕ, желтушная форма, средней тяжести.

Из образцов биологического материала, полученных от пациентов, была выделена РНК ВГЕ (рис. 2).

На основе филогенетического анализа последовательностей, кодирующих фрагмент белка капсида вируса, построено филогенетическое дерево, которое позволило оценить степень генетического родства последовательностей ВГЕ, выделенных из биологического материала, полученного из организмов изучаемых пациентов, с последовательностями, выделенными из организма человека и животных в Беларуси в более ранний период, а также с референсными последовательностями ВГЕ, установленными для генотипов и субгенотипов, и гомологичными последовательностями из базы данных GenBank (рис. 3).

Последовательность, выделенная из организма пациента Patient_Cx_BY_2021|g3, относится к генотипу ВГЕ-3 и кластеризуется в пределах клады

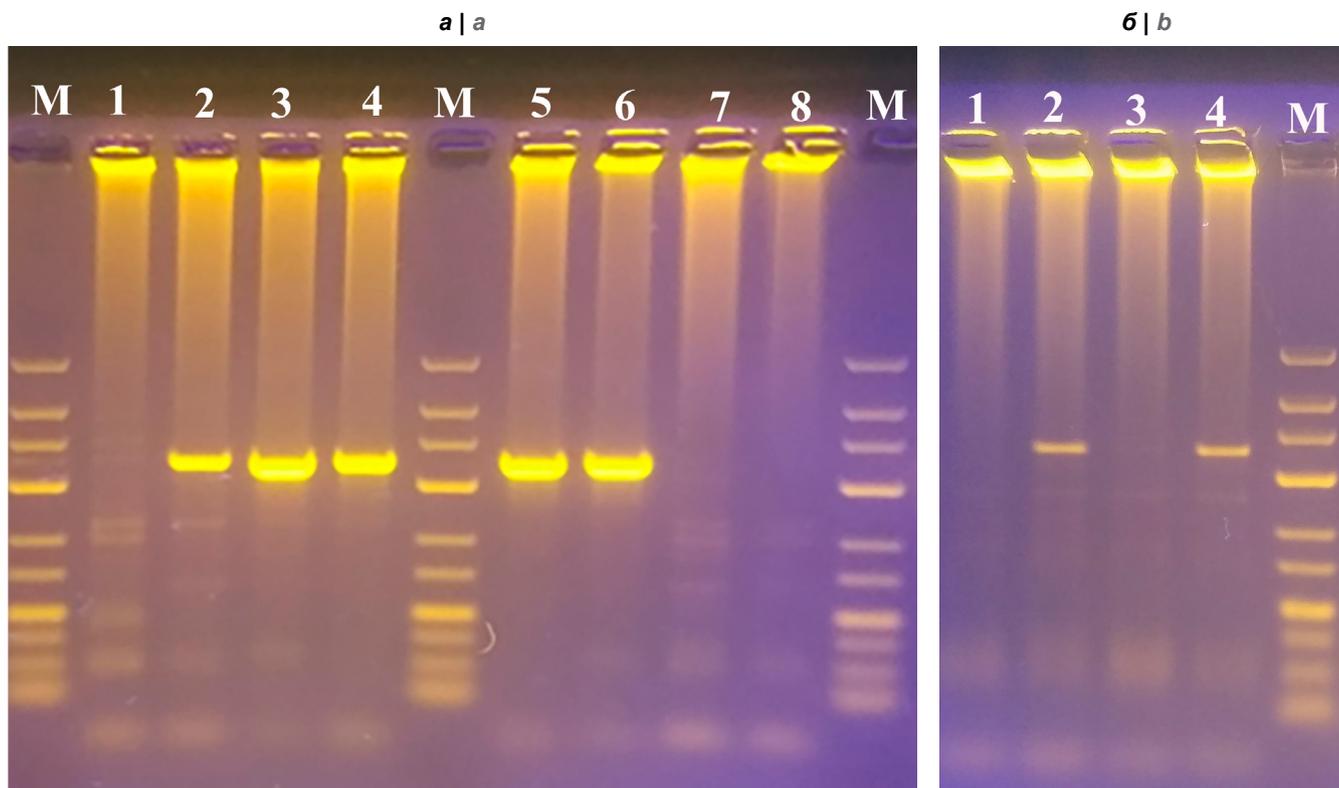


Рис. 2. Фрагменты электрофореграмм результатов гнездовой ОТ-ПЦР.

1–8 — номера образцов; М — дорожка маркера молекулярного веса.

a — Patient_Cx_BY_2021|g3: 1 — грудное молоко; 2 — сыворотка крови; 3 и 4 — кал; 5 и 6 — моча от 24.02.2021; 7 и 8 — кал от 20.03.2021; *б* — Patient_Sh_BY_2022|g1: 1 и 3 — сыворотка крови; 2 и 4 — кал.

Fig. 2. Fragments of electrophoregrams of the results of nested RT-PCR.

1–8 sample numbers; M — lane of the molecular weight marker.

a — Patient_Cx_BY_2021|g3: 1 — breast milk; 2 — blood serum; 3 and 4 — feces; 5 and 6 — urine from 02/24/2021; 7 and 8 — feces from 03/20/2021; *b* — Patient_Sh_BY_2022|g1: 1 and 3 — blood serum; 2 and 4 — feces.

Зefg. Эта последовательность в 100% репликаций образует общую филогенетическую ветвь с двумя другими, выделенными из организма человека в Беларуси: MT518198_H.s_BY_2021|g3 и Patient_Pf_BY_2019|3. Величина р-эволюционной дистанции между последовательностью, выделенной из организма пациента Patient_Cx_BY_2021|g3, и последовательностью Patient_Pf_BY_2019|3, выделенной из организма пациента, являющегося реципиентом почечного трансплантата в Беларуси в 2019 г. (код в базе GenBank: MT325974) составляет $0,015 \pm 0,008$, что свидетельствует о высокой степени их генетического сходства. Данный факт позволяет утверждать о наличии общего источника заражения ВГЕ обоих пациентов и эпидемиологической связи между этими случаями заболевания ГЕ. Наличие в эпидемиологическом анамнезе пациента эпизода алиментарного контакта с сырым свиным фаршем и высокой степени генетической однородности последовательностей ВГЕ, выделенных из его организма с последовательностями, выделенными из организма домашней свиньи в России и в Эстонии (рис. 2; таблица), что подтверждается незначительными эволюционными дистанциями между ними, позво-

ляет констатировать зоонозный характер источника заражения ГЕ. Ввиду отсутствия выезда пациента за пределы Беларуси в рамках инкубационного периода заболевания, данный случай следует считать автохтонным.

Последовательность РНК, выделенной из организма пациента Patient_Sh_BY_2022|g1, относится к генотипу ВГЕ-1. Возможность завоза на территорию Беларуси штаммов ВГЕ, имеющих высокий эпидемический потенциал, обсуждалась нами ранее [25]. Генотипирование данной последовательности не имеет однозначной трактовки. На online-платформе «Automated genotyping and interpretation HEV»² были установлены весовые коэффициенты клады для данной последовательности. С вероятностью 32,8% эту последовательность можно отнести к субгенотипу ВГЕ-1a и с вероятностью 25,23% — к субгенотипу ВГЕ-1f. Эта последовательность в 54% репликаций образует общую филогенетическую ветвь с рядом последовательностей, выделенных из организма человека в странах Юго-Вос-

² HEV-GLUE. MRC-University of Glasgow Centre for Virus Research. Available at: <http://hev.glue.cvr.ac.uk/#/analysisTool>

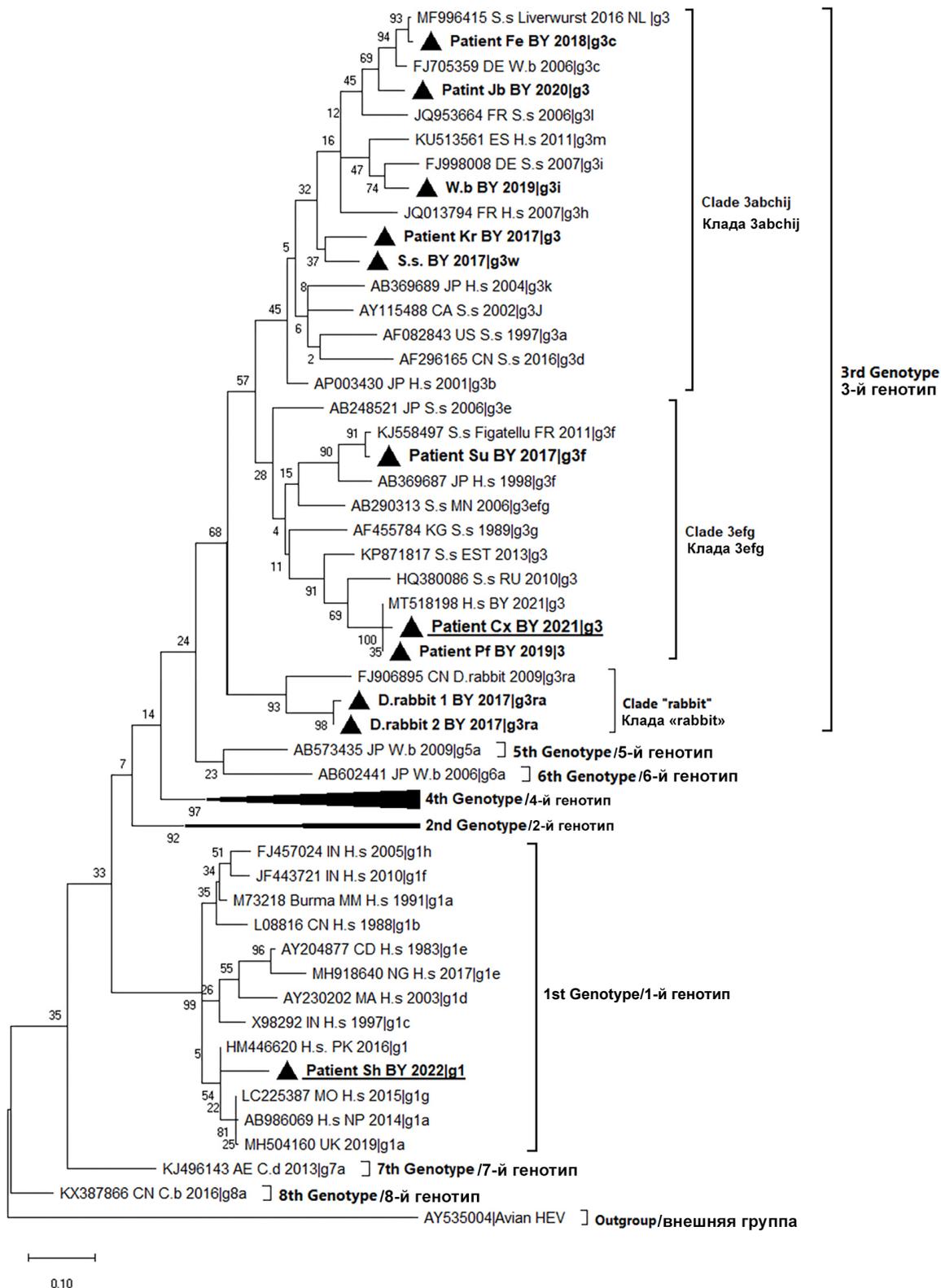


Рис. 3. Филогенетическое дерево для частичной последовательности ORF2.

▲ — последовательности, выделенные в Беларуси. Расшифровка кода последовательности: AAAAAAAA_BB_C.c_DDDD|EEF: A — код доступа в базе GenCode NCBI; B — код страны происхождения последовательности; C — сокращённое название вида хозяина; D — год выделения последовательности; E — генотип вируса; F — субгенотип.

Fig. 3. Phylogenetic tree for the partial ORF2 sequence.

▲ — sequences identified in Belarus. Sequence ID decoding: AAAAAAAA_BB_C.c_DDDD|EEF: A — accession number in the GenBank NCBI database; B — code of the country of the sequence origin; C — abbreviated name of the host species; D — year of the sequence isolation; E — virus genotype; F — subgenotype.

Значения попарных эволюционных дистанций между нуклеотидными последовательностями ВГЕ, выделенными из организма пациентов в Республике Беларусь, а также последовательностями ВГЕ для сравнения, являющимися наиболее близкими, выявленными при помощи BLAST-анализа

Values of pairwise evolutionary distances between HEV nucleotide sequences isolated from the body of patients in the Republic of Belarus, as well as HEV sequences for comparison, which are the closest identified by BLAST analysis

№ No.	Коды последовательностей на дендрограмме Sequence IDs on the dendrogram	Эволюционное расстояние p-distance	Коды последовательностей, выявленных при помощи BLAST-анализа IDs of sequences identified by BLAST analysis
1	Patient_Cx_BY_2021 g3	0,015 ± 0,008	MT325974_H.s_BY_2019 3
2	Patient_Cx_BY_2021 g3	0,015 ± 0,008	MT518198_H.s_BY_2021 g3
3	Patient_Cx_BY_2021 g3	0,120 ± 0,023	HQ380086_S.s_RU_2010 g3
4	Patient_Cx_BY_2021 g3	0,128 ± 0,023	KP871817_S.s_EST_2013 g3
5	Patient_Pf_BY_2019 3	0,000 ± 0,000	MT518198_H.s_BY_2021 g3
6	Patient_Sh_BY_2022 g1	0,073 ± 0,017	NM446620_H.s_PK_2016 g1
7	Patient_Sh_BY_2022 g1	0,094 ± 0,019	AB986069_H.s_NP_2014 g1a
8	Patient_Sh_BY_2022 g1	0,098 ± 0,020	LC225387_MO_H.s_2015 g1g

точной Азии (таблица). Наименьшее значение р-эволюционной дистанции, составляющее $0,073 \pm 0,017$, разделяет последовательности Patient_Sh_BY_2022|g1, выделенную из организма пациента в Беларуси, и NM446620_H.s_PK_2016|g1, выделенную из организма пациента в Пакистане. Незначительная величина эволюционной дистанции между этими двумя последовательностями, свидетельствующая о высокой степени их гомологичности, а также наличие в эпидемиологическом анамнезе пациента эпизода выезда за пределы Беларуси в Пакистан позволяют утверждать, что данный случай ГЕ является завозным.

Обсуждение

Как отмечалось нами ранее, частота встречаемости анamnестических антител к ВГЕ в общей популяции условно здорового населения Беларуси составляет 7,3% [26], что эквивалентно примерно 10 тыс. ежегодных случаев ВГЕ-инфекции и явно не согласуется с официальными показателями заболеваемости ГЕ в Беларуси, составляющими 0,02–0,04 на 100 тыс. населения. Это означает, что 99,9% первичных инфекций ВГЕ остаются недиагностированными. Подобная особенность ещё в большей степени выражена в некоторых странах Западной Европы (Франция, Германия, Нидерланды и Польша), являющихся анклавами по ГЕ, где показатель частоты выявления анти-ВГЕ IgG в общей популяции почти двукратно превышает его значение в Беларуси [27]. Факты, объясняющие существование «парадокса Балаяна» [28], несомненно, лежат в плоскости молекулярно-генетической организации ВГЕ. Одно из возможных объяснений низкой частоты симптоматической инфекции ВГЕ заключается в том, что разные варианты ВГЕ-3 обладают разным патогенным потенциалом. Хотя в настоящее время не получено достоверных данных, подтверждающих это, всё же ряд исследований показывает, что

штаммы ВГЕ-3, относящиеся к кладе 3efg, являются более патогенными [29]. Недавнее исследование образцов биологического материала, полученных от белорусских доноров, позволило выявить РНК ВГЕ в АЛТ-положительной сыворотке с высоким титром анти-ВГЕ IgM, что доказывает существование интенсивного эпидемического процесса ГЕ в стране. Таким образом, проведение молекулярно-эпидемиологических исследований, включающих генотипирование вариантов ВГЕ, циркулирующих на территории Беларуси, имеет высокую актуальность.

Проведённые нами исследования показали, что на территории Беларуси циркулируют возбудители ГЕ, относящиеся к разным генотипам и субгенотипам, имеющие различный механизм распространения и отличающиеся по эпидемическому потенциалу. Нами выявлен случай острого ГЕ у беременной, сопровождающийся выраженной клинической манифестацией. Возбудитель был генотипирован как ВГЕ-3 клада 3efg. К счастью, данный случай гепатита беременной не привёл к осложнениям для плода и благополучно завершился для матери. Однако нами был ранее описан клинический случай с аналогичным эпидемическим анамнезом, завершившийся антенатальной гибелью плода [30], что придаёт данному исследованию больший вес.

Учитывая, что ГЕ у беременных может прогрессировать до фульминантного гепатита, скрининг ГЕ у этой группы пациентов должен стать нормой оказания акушерско-гинекологической помощи. Необходимо информировать беременных о потенциальном воздействии ВГЕ на их организм и плод, о существовании вероятных неблагоприятных исходов для беременной и плода. Им следует рекомендовать избегать употребления пищевых продуктов и воды, являющихся возможными источниками ВГЕ. В случае осложнённого течения беременности и родов необходимо использовать только

отрицательную по РНК ВГЕ донорскую кровь и её компоненты. Наконец, существует также существенная потребность в разработке новых методов лечения ГЕ во время беременности.

Исходя из имеющихся данных, нельзя утверждать о преобладании циркуляции того или иного субгенотипа ВГЕ на территории Беларуси. Из 11 последовательностей РНК, выделенных в Беларуси, 7 было получено из организма человека, из которых 6 отнесены к ВГЕ-3, 1 — к ВГЕ-1. Три из 6 «белорусских» последовательностей ВГЕ-3 относятся к кладе Zefg, 3 — к кладе Zabchij. Из 4 последовательностей ВГЕ-3, полученных от животных, 2 от кроликов генотипированы как ВГЕ-3 rabbit, 2 от свиней отнесены к кладе Zabchij [31].

Результаты проведённых исследований свидетельствуют о существовании значительных рисков завоза ВГЕ на территорию Беларуси. Доказан эпизод завоза ВГЕ с гиперэндемичной по ГЕ территории. Последовательность, выделенная из организма пациента с клиническими проявлениями острого ГЕ, с вероятностью 100% отнесена к ВГЕ-1. Данная последовательность на 94,3% гомологична последовательности, ранее выделенной от пациента в Пакистане. При формировании соответствующих условий генотип ВГЕ, обладающий значительным эпидемическим потенциалом, может стать причиной развития вспышек ГЕ. Это может быть подтверждено описанным нами ранее случаем заболевания острым ГЕ в безжелтушной форме иностранной студентки [30], которая проживала в общежитии для иностранных студентов и не выезжала за пределы Беларуси в течение последних 2 лет. Существование рисков завоза ВГЕ в Беларусь с гиперэндемичных территорий обуславливает необходимость организации мониторинга иностранных граждан на анти-ВГЕ IgM и РНК ВГЕ при их прибытии в Беларусь и прохождении ими медицинских осмотров.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Balayan M.S., Andjaparidze A.G., Savinskaya S.S., Ketiladze E.S., Braginsky D.M., Savinov A.P., et al. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology*. 1983; 20(1): 23–31. <https://doi.org/10.1159/000149370>
2. Purdy M.A., Harrison T.J., Jameel S., Meng X.J., Okamoto H., Van der Poel W.H.M., et al. ICTV virus taxonomy profile: Hepviridae. *J. Gen. Virol.* 2017; 98(11): 2645–6. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000940>
3. Lee G.H., Tan B.H., Teo E.C., Lim S.G., Dan Y.Y., Wee A., et al. Chronic infection with camelid hepatitis E virus in a liver transplant recipient who regularly consumes camel meat and milk. *Gastroenterology*. 2016; 150(2): 355–7.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.10.048>
4. Pallerla S.R., Harms D., John R., Todt D., Steinmann E., Schemmerer M., et al. Hepatitis E virus infection: circulation, molecular epidemiology, and impact on global health. *Pathogens*. 2020; 9(10): 856. <https://doi.org/10.3390/pathogens9100856>
5. Nimgaonkar I., Ding Q., Schwartz R.E., Ploss A. Hepatitis E virus: advances and challenges. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2018; 15(2): 96–110. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.150>
6. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines on hepatitis E virus infection. *J. Hepatol.* 2018; 68(6): 1256–71. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.005>
7. Li P., Liu J., Li Y., Su J., Ma Z., Bramer W.M., et al. The global epidemiology of hepatitis E virus infection: A systematic review and meta-analysis. *Liver. Int.* 2020; 40(7): 1516–28. <https://doi.org/10.1111/liv.14468>
8. Pérez-Gracia M.T., Suay-García B., Mateos-Lindemann M.L. Hepatitis E and pregnancy: current state. *Rev. Med. Virol.* 2017; 27(3): e1929. <https://doi.org/10.1002/rmv.1929>
9. Patra S., Kumar A., Trivedi S.S., Puri M., Sarin S.K. Maternal and fetal outcomes in pregnant women with acute hepatitis E virus infection. *Ann. Intern. Med.* 2007; 147(1): 28–33. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-147-1-200707030-00005>
10. Kinast V., Burkard T.L., Todt D., Steinmann E. Hepatitis E virus drug development. *Viruses*. 2019; 11(6): 485. <https://doi.org/10.3390/v11060485>
11. Wu C., Wu X., Xia J. Hepatitis E virus infection during pregnancy. *Virol. J.* 2020; 17(1): 73. <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01343-9>
12. El-Mokhtar M.A., Othman E.R., Khashbah M.Y., Ismael A., Ghaliony M.A., Seddik M.I., et al. Evidence of the extrahepatic replication of hepatitis e virus in human endometrial stromal cells. *Pathogens*. 2020; 9(4): 295. <https://doi.org/10.3390/pathogens9040295>
13. Nagashima S., Takahashi M., Kobayashi T., Nishizawa T., Nishiyama T., Primadharsini P.P., et al. Characterization of the Quasi-Enveloped Hepatitis E Virus Particles Released by the Cellular Exosomal Pathway. *J. Virol.* 2017; 91(22): e00822-17. <https://doi.org/10.1128/jvi.00822-17>
14. Marion O., Lhomme S., Nayrac M., Dubois M., Pucelle M., Requena M., et al. Hepatitis E virus replication in human intestinal cells. *Gut*. 2020; 69(5): 901–10. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-319004>
15. Debing Y., Moradpour D., Neyts J., Gouttenoire J. Update on hepatitis E virology: Implications for clinical practice. *J. Hepatol.* 2016; 65(1): 200–12. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.02.045>
16. Montpellier C., Wychowski C., Sayed I.M., Meunier J.C., Saliou J.M., Ankavay M., et al. Hepatitis E virus lifecycle and identification of 3 forms of the ORF2 capsid protein. *Gastroenterology*. 2018; 154(1): 211–23.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.09.020>
17. Graff J., Torian U., Nguyen H., Emerson S.U. A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus. *J. Virol.* 2006; 80(12): 5919–26. <https://doi.org/10.1128/jvi.00046-06>
18. Yadav K.K., Boley P.A., Fritts Z., Kenney S.P. Ectopic expression of genotype 1 hepatitis E virus ORF4 increases genotype 3 HEV viral replication in cell culture. *Viruses*. 2021; 13(1): 75. <https://doi.org/10.3390/v13010075>
19. Smith D.B., Izopet J., Nicot F., Simmonds P., Jameel S., Meng X.J., et al. Update: proposed reference sequences for subtypes of hepatitis E virus (species Orthohepevirus A). *J. Gen. Virol.* 2020; 101(7): 692–8. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001435>
20. Красочко П.А., Жаворонок С.В., Борисовец Д.С., Красочко П.П., Алаторцева Г.И., Прокопенкова Т.М. и др. Разработка тест-системы для полуколичественного выявления антител у свиней к вирусу гепатита Е в Республике Беларусь. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия аграрных наук*. 2020; (3): 339–51. <https://doi.org/10.29235/1817-7204-2020-58-3-339-351>
21. Алаторцева Г.И., Сидоров А.В., Нестеренко Л.Н., Лухверчик Л.Н., Амиантова И.И., Доценко В.В. и др. Рекомбинант-

- ный белок, содержащий антигенно-значимые фрагменты белков вируса гепатита E, используемый в тест-системах для серодиагностики гепатита E (варианты). Патент РФ 2711907 C2; 2020.
22. Арабей А.А., Марчук С.И., Жаворонок С.В., Давыдов В.В., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Адаптированный метод полимеразной цепной реакции для выявления вируса гепатита E у человека и животных. *Военная медицина*. 2018; (3): 86–92.
 23. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6): 1547–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
 24. Hasegawa M., Kishino H., Yano T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 1985; 22(2): 160–74. <https://doi.org/10.1007/bf02101694>
 25. Давыдов В.В., Жаворонок С.В., Анисько Л.А., Гасич Е.Л., Марчук С.И., Семизон П.А. и др. Изучение рисков завоза гепатита E в Республику Беларусь. *БГМУ в авангарде медицинской науки и практики: Сборник научных трудов*. 2020; (10): 285–90.
 26. Давыдов В.В., Жаворонок С.В., Рогачева Т.А., Новик Т.П., Алатортсева Г.И., Нестеренко Л.Н. и др. Распространённость антител к вирусу гепатита E у населения регионов Республики Беларусь. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022; 99(2): 160–71. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-236>
 27. Li P., Liu J., Li Y., Su J., Ma Z., Bramer W.M., et al. The global epidemiology of hepatitis E virus infection: A systematic review and meta-analysis. *Liver Int.* 2020; 40(7): 1516–28. <https://doi.org/10.1111/liv.14468>
 28. Михайлов М.И., Малинникова Е.Ю., Кюрегян К.К., Потемкин И.А., Алсалих Н.Д., Исаева О.В. и др. Парадокс Балаяна. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019; 96(1): 80–5. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-1-80-85>
 29. Smith D.B., Ijaz S., Tedder R.S., Hogema B., Zaaijer H.L., Izopet J., et al. Variability and pathogenicity of hepatitis E virus genotype 3 variants. *J. Gen. Virol.* 2015; 96(11): 3255–64. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000264>
 30. Жаворонок С.В., Карпов И.А., Михайлов М.И., Арабей А.А., Кашкур Ю.В., Кюрегян К.К. и др. Интенсивность эпидемического и эпизоотического процессов инфекции, вызванной вирусом гепатита E, на территории Республики Беларусь. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2019; 8(1): 11–22. <https://doi.org/10.24411/2305-3496-2019-11001>
 31. Давыдов В.В. Генетический полиморфизм вируса гепатита E в Республике Беларусь. *Клиническая инфектология и паразитология*. 2020; 9(3): 297–305. <https://doi.org/10.34883/PI.2020.9.3.029>
 4. Pallerla S.R., Harms D., Johne R., Todt D., Steinmann E., Schemmerer M., et al. Hepatitis E virus infection: circulation, molecular epidemiology, and impact on global health. *Pathogens*. 2020; 9(10): 856. <https://doi.org/10.3390/pathogens9100856>
 5. Ningaonkar I., Ding Q., Schwartz R.E., Ploss A. Hepatitis E virus: advances and challenges. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2018; 15(2): 96–110. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.150>
 6. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines on hepatitis E virus infection. *J. Hepatol.* 2018; 68(6): 1256–71. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.005>
 7. Li P., Liu J., Li Y., Su J., Ma Z., Bramer W.M., et al. The global epidemiology of hepatitis E virus infection: A systematic review and meta-analysis. *Liver Int.* 2020; 40(7): 1516–28. <https://doi.org/10.1111/liv.14468>
 8. Pérez-Gracia M.T., Suay-García B., Mateos-Lindemann M.L. Hepatitis E and pregnancy: current state. *Rev. Med. Virol.* 2017; 27(3): e1929. <https://doi.org/10.1002/rmv.1929>
 9. Patra S., Kumar A., Trivedi S.S., Puri M., Sarin S.K. Maternal and fetal outcomes in pregnant women with acute hepatitis E virus infection. *Ann. Intern. Med.* 2007; 147(1): 28–33. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-147-1-200707030-00005>
 10. Kinast V., Burkard T.L., Todt D., Steinmann E. Hepatitis E virus drug development. *Viruses*. 2019; 11(6): 485. <https://doi.org/10.3390/v11060485>
 11. Wu C., Wu X., Xia J. Hepatitis E virus infection during pregnancy. *Virol. J.* 2020; 17(1): 73. <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01343-9>
 12. El-Mokhtar M.A., Othman E.R., Khashbah M.Y., Ismael A., Ghalyon M.A., Seddik M.I., et al. Evidence of the extrahepatic replication of hepatitis e virus in human endometrial stromal cells. *Pathogens*. 2020; 9(4): 295. <https://doi.org/10.3390/pathogens9040295>
 13. Nagashima S., Takahashi M., Kobayashi T., Nishizawa T., Nishiyama T., Primadharsini P.P., et al. Characterization of the Quasi-Enveloped Hepatitis E Virus Particles Released by the Cellular Exosomal Pathway. *J. Virol.* 2017; 91(22): e00822-17. <https://doi.org/10.1128/jvi.00822-17>
 14. Marion O., Lhomme S., Nayrac M., Dubois M., Pucelle M., Requena M., et al. Hepatitis E virus replication in human intestinal cells. *Gut*. 2020; 69(5): 901–10. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-319004>
 15. Debing Y., Moradpour D., Neyts J., Gouttenoire J. Update on hepatitis E virology: Implications for clinical practice. *J. Hepatol.* 2016; 65(1): 200–12. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.02.045>
 16. Montpellier C., Wychowski C., Sayed I.M., Meunier J.C., Saliou J.M., Ankavay M., et al. Hepatitis E virus lifecycle and identification of 3 forms of the ORF2 capsid protein. *Gastroenterology*. 2018; 154(1): 211–23.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.09.020>
 17. Graff J., Torian U., Nguyen H., Emerson S.U. A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus. *J. Virol.* 2006; 80(12): 5919–26. <https://doi.org/10.1128/jvi.00046-06>
 18. Yadav K.K., Boley P.A., Fritts Z., Kenney S.P. Ectopic expression of genotype 1 hepatitis E virus ORF4 increases genotype 3 HEV viral replication in cell culture. *Viruses*. 2021; 13(1): 75. <https://doi.org/10.3390/v13010075>
 19. Smith D.B., Izopet J., Nicot F., Simmonds P., Jameel S., Meng X.J., et al. Update: proposed reference sequences for subtypes of hepatitis E virus (species Orthohepevirus A). *J. Gen. Virol.* 2020; 101(7): 692–8. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001435>
 20. Krasochko P.A., Zhavoronok S.V., Borisovets D.S., Krasochko P.P., Alatoritseva G.I., Prokopenkova T.M., et al. Development of elisa test kits for semi-quantitative detection of anti-hev antibodies in pigs in the republic of Belarus. *Izvestiya Natsion-*

REFERENCES

- al'noy akademii nauk Belarusi. Seriya agrarnykh nauk.* 2020; (3): 339–51. <https://doi.org/10.29235/1817-7204-2020-58-3-339-351> (in Russian)
21. Alatorseva G.I., Sidorov A.V., Nesterenko L.N., Lukhverchik L.N., Amiantova I.I., Dotsenko V.V., et al. Recombinant protein containing antigenically significant fragments of hepatitis E virus proteins used in test systems for hepatitis E serodiagnosis (versions). Patent RF 2711907 C2; 2020. (in Russian)
 22. Arabey A.A., Marchuk S.I., Zhavoronok S.V., Davydov V.V., Kyuregyan K.K., Mikhaylov M.I. Adapted polymerase chain reaction method for detecting hepatitis E virus in humans and animals. *Voennaya meditsina.* 2018; (3): 86–92. (in Russian)
 23. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6): 1547–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
 24. Hasegawa M., Kishino H., Yano T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 1985; 22(2): 160–74. <https://doi.org/10.1007/bf02101694>
 25. Davydov V.V., Zhavoronok S.V., Anis'ko L.A., Gasich E.L., Marchuk S.I., Semizhon P.A. et al. Study of the risks of hepatitis E importation to the Republic of Belarus. *BSMU in the Vanguard of Medical Science and Practice: The Scientific Works Collection.* 2020; (10): 285–90. (in Russian)
 26. Davydov V.V., Zhavoronok S.V., Rogacheva T.A., Novik T.P., Alatorseva G.I., Nesterenko L.N. et al. Prevalence of antibodies to the hepatitis E virus in the population of the Republic of Belarus. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2022; 99(2): 160–71. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-236> (in Russian)
 27. Li P., Liu J., Li Y., Su J., Ma Z., Bramer W.M., et al. The global epidemiology of hepatitis E virus infection: A systematic review and meta-analysis. *Liver Int.* 2020; 40(7): 1516–28. <https://doi.org/10.1111/liv.14468>
 28. Mikhaylov M.I., Malinnikova E.Yu., Kyuregyan K.K., Potemkin I.A., Alsaliikh N.D., Isaeva O.V. et al. Balayan paradox. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2019; 96(1): 80–5. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-1-80-85> (in Russian)
 29. Smith D.B., Ijaz S., Tedder R.S., Hogema B., Zaaijer H.L., Izopet J., et al. Variability and pathogenicity of hepatitis E virus genotype 3 variants. *J. Gen. Virol.* 2015; 96(11): 3255–64. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000264>
 30. Zhavoronok S.V., Karpov I.A., Mikhaylov M.I., Arabey A.A., Kashkur Yu.V., Kyuregyan K.K., et al. The intensity of the epidemic and epizootic processes of infection caused by the hepatitis E virus in the territory of the Republic of Belarus. *Infektsionnye Bolezni: Novosti, Mneniya, Obuchenie.* 2019; 8(1): 11–22. <https://doi.org/10.24411/2305-3496-2019-11001> (in Russian)
 31. Davydov V.V. Genetic diversity of hepatitis e virus in the republic of Belarus. *Klinicheskaya infektologiya i parazitologiya.* 2020; 9(3): 297–305. <https://doi.org/10.34883/PI.2020.9.3.029> (in Russian)

Информация об авторах

Давыдов Владимир Витольдович — к.б.н., доцент, зав. каф. биологии Белорусского государственного медицинского университета, Минск, Республика Беларусь, davidovvv@bsmu.by, <https://orcid.org/0000-0002-5672-9509>

Жаворонок Сергей Владимирович — д.м.н., профессор, профессор каф. инфекционных болезней Белорусского государственного медицинского университета, Минск, Республика Беларусь, <https://orcid.org/0000-0001-9727-1103>

Зновец Татьяна Владимировна — к.м.н., зам. главного врача по родовспоможению Третьей Городской клинической больницы им. Е.В. Клумова, Минск, Республика Беларусь, <https://orcid.org/0000-0002-5603-490X>

Цыркунов Владимир Максимович — д.м.н., профессор, профессор каф. инфекционных болезней Гродненского государственного медицинского университета, Гродно, Республика Беларусь, <https://orcid.org/0000-0002-9366-6789>

Бабенко Андрей Сергеевич — к.х.н., доцент, доцент кафедры биоорганической химии Белорусского государственного медицинского университета, Минск, Республика Беларусь, <https://orcid.org/0000-0002-5513-970X>

Марчук Светлана Ивановна — н.с. лаб. биохимических методов исследования научной части Белорусского государственного медицинского университета, Минск, Республика Беларусь, <https://orcid.org/0000-0002-2291-4538>

Гасич Елена Леонидовна — д.б.н., доцент, зав. лаб. диагностики ВИЧ и сопутствующих инфекций Республиканского научно-практического центра эпидемиологии и микробиологии, Минск, Республика Беларусь, <https://orcid.org/0000-0002-3662-3045>

Новик Татьяна Петровна — к.б.н., доцент каф. биологии Белорусского государственного медицинского университета, Минск, Республика Беларусь, <https://orcid.org/0000-0002-3220-9592>

Алаторцева Галина Ивановна — к.б.н., зав. лаб. клонирования вирусных геномов НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9887-4061>

Михайлов Михаил Иванович — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, зав. лаб. вирусных гепатитов НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия; научный руководитель Института молекулярной и персонализированной медицины Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6636-6801>

Information about the authors

Vladimir V. Davydov — Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Head, Department of biology, Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus, davidovvv@bsmu.by, <https://orcid.org/0000-0002-5672-9509>

Sergey V. Zhavoronok — D. Sci. (Med.), Professor, Department of infectious diseases, Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus, <https://orcid.org/0000-0001-9727-1103>

Tatyana V. Znovets — Cand. Sci. (Med.), Deputy chief physician for obstetrics, Third City Clinical Hospital named after E.V. Klumov, Minsk, Republic of Belarus, <https://orcid.org/0000-0002-5603-490X>

Vladimir M. Tsyrukunov — D. Sci. (Med.), Professor, Department of infectious diseases, Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus, <https://orcid.org/0000-0002-9366-6789>

Andrei S. Babenka — Cand. Sci. (Chem.), Associate Professor, Department of bioorganic chemistry, Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus, <https://orcid.org/0000-0002-5513-970X>

Svetlana I. Marchuk — researcher, Laboratory of biochemical research methods of the scientific part, Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus, <https://orcid.org/0000-0002-2291-4538>

Elena L. Gasich — D. Sci. (Biol.), Associate Professor, Head, Laboratory for diagnosis of HIV and concomitant infections, Republican Scientific and Practical Center of Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus, <https://orcid.org/0000-0002-3662-3045>

Tatiana P. Novik — Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Department of biology, Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus, <https://orcid.org/0000-0002-3220-9592>

Galina I. Alatorseva — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory for cloning viral genomes, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9887-4061>

Mikhail I. Mikhailov — D. Sci. (Med.), Professor, Corresponding member of the Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory for viral hepatitis, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia; Scientific Director, Institute of Molecular and Personalized Medicine, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6636-6801>

Зверев Виталий Васильевич — д.б.н., профессор, академик РАН, научный руководитель НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия; зав. каф. микробиологии, вирусологии, иммунологии ПМГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0017-1892>

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 30.08.2022;
принята к публикации 01.11.2022;
опубликована 30.12.2022

Vitaly V. Zverev — D. Sci. (Biol.), Professor, Full Member of the Russian Academy of Sciences, scientific director, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia; Head, Department of microbiology, virology, immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0017-1892>

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 30.08.2022;
accepted for publication 01.11.2022;
published 30.12.2022



Молекулярно-генетическая характеристика полноразмерного генома вируса гепатита В у HBsAg-негативных доноров крови в Уральском федеральном округе

Останкова Ю.В.^{1✉}, Серикова Е.Н.¹, Семенов А.В.², Зуева Е.Б.¹, Валутите Д.Э.¹, Щемелев А.Н.¹, Зурочка В.А.^{3,4}, Тотолян А.А.^{1,5}

¹Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

²Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Екатеринбург, Россия;

³Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия;

⁴Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет), Челябинск, Россия;

⁵Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация

Актуальность. По оценкам Всемирной организации здравоохранения, на конец 2019 г. более чем у 296 млн человек в мире зарегистрирован хронический вирусный гепатит В (ВГВ). Распространённость HBsAg-негативной, скрытой формы течения заболевания у доноров крови варьирует в зависимости от региона мира и чувствительности используемых методов анализа. Поскольку генетическое разнообразие вирусов демонстрирует пространственно-временные вариации, а генетический профиль изолятов в ключевых группах, потенциально способных становиться источником распространения патогена, важен для прогнозирования эпидемиологической ситуации, представляется значимым определить циркулирующие среди доноров крови в регионах России генотипы ВГВ.

Цель работы — молекулярно-генетическая характеристика геномов ВГВ, выявленных у HBsAg-негативных доноров крови в Уральском федеральном округе.

Материалы и методы. Материалом исследования служили 1400 образцов плазмы, полученных от HBsAg-негативных доноров крови Уральского федерального округа. Исследование включало определение HBsAg, антител анти-HBs IgG, анти-HBcore IgG, ДНК ВГВ. Для всех выявленных образцов проводили секвенирование и анализ нуклеотидных последовательностей полных геномов ВГВ.

Результаты. Распространённость ДНК ВГВ составила 4,93%, в том числе 4 (0,28%) случая ложного скрытого гепатита В. Среди анти-HBcore IgG-положительных образцов ДНК ВГВ обнаружили в 18,08% случаев, в то время как у лиц с выявленной ДНК ВГВ анти-HBcore IgG — в 46,38%. У 8,69% изолятов обнаружены одновременно антитела анти-HBs IgG и ДНК вируса при отсутствии анти-HBcore IgG. На основании филогенетического анализа показано, что у HBsAg-негативных доноров крови представлены субгенотипы ВГВ в следующих соотношениях: D3 — 53,62%, D2 — 21,74%, D1 — 18,84%, C2 — 5,8%. Показана высокая вариабельность регионов S, C, P генома вируса в обследованной группе. Во всех выявленных нами случаях HBsAg-негативного хронического ВГВ у доноров крови были представлены вирусы, по крайней мере, с одной аминокислотной заменой в положениях, мутации в которых действуют как ускользающие от вакцины. В регионе обратной транскриптазы гена P в 3 (4,35%) случаях определены мутации устойчивости вируса к лекарственным препаратам: ламивудину, телбивудину, энтекавиру. В регионах preCore/Core выявлены мутации, способствующие прогрессированию заболевания печени.

Заключение. Скрытый, HBsAg-негативный хронический ВГВ представляет собой угрозу передачи ВГВ при переливании крови и её компонентов за счёт крайне низкой вирусной нагрузки, не позволяющей определить вирус с помощью рутинно используемых диагностических наборов. Ситуацию может усугубить выявленное нами обилие и разнообразие аминокислотных замен вируса, включающих мутации иммунологического избегания, мутации фармакорезистентности и мутации, способствующие прогрессированию развития заболевания.

Ключевые слова: вирус гепатита В, скрытый гепатит В, серологические маркеры, молекулярно-биологические маркеры, вариабельность ВГВ, генотипы, клинически значимые мутации, лабораторная диагностика

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (протоколы № 67 от 22.02.2017 и № 97 от 29.01.2020).

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

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

Для цитирования: Останкова Ю.В., Серикова Е.Н., Семенов А.В., Зуева Е.Б., Валутите Д.Э., Щемелев А.Н., Зурочка В.А., Тотолян А.А. Молекулярно-генетическая характеристика полноразмерного генома вируса гепатита В у HBsAg-негативных доноров крови в Уральском федеральном округе. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(6):637–650.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-325>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-325>

Molecular and genetic characterization of the hepatitis B virus full-length genome sequences identified in HBsAg-negative blood donors in Ural Federal District

Yulia V. Ostankova¹✉, Elena N. Serikova¹, Aleksandr V. Semenov², Elena B. Zueva¹,
Diana E. Valutite¹, Aleksandr N. Schemeleev¹, Vladimir A. Zurochka^{3,4}, Areg A. Totolian^{1,5}

¹St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia;

²State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Ekaterinburg, Russia;

³Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia;

⁴South-Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russia;

⁵I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia

Abstract

Introduction. The World Health Organization estimates that as of 2019, more than 296 million people were living with chronic hepatitis B virus (HBV) infection. The prevalence of HBsAg-negative, occult form of the disease in blood donors varies depending on the region of the world and the sensitivity of the methods of analysis used. Considering that the genetic diversity of viruses demonstrates space and time variations and taking into account that the genetic profile of isolates in key groups, which may turn into a source of the pathogen spread, is important for forecasting of the epidemiological situation, the attention should be given to identification of HBV genotypes currently circulating among regular blood donors in regions of the Russian Federation.

The **aim** of this work was molecular and genetic characterization of HBV genomes identified in HBsAg-negative blood donors in the Ural Federal District.

Materials and methods. The study material was 1400 plasma samples obtained from HBsAg-negative blood donors in Ural Federal District. The study included the testing for HBsAg, anti-HBs IgG and anti-HBcore IgG antibodies, HBV DNA. For all identified HBV DNA containing samples, sequencing and analysis of the nucleotide sequences of the complete HBV genomes were performed.

Results. The prevalence of HBV DNA was 4.93%, including 4 (0.28%) cases of false occult hepatitis B. Among anti-HBcore IgG-positive samples, HBV DNA was found in 18.08% of cases, while in persons with detected HBV DNA the anti-HBcore IgG positivity rate was 46.38%. In 8.69% of the isolates, anti-HBs IgG antibodies and viral DNA were detected simultaneously in the absence of anti-HBcore IgG. Based on phylogenetic analysis, HBV subgenotypes distribution in HBsAg-negative blood donors was as follows: D3 — 53.62%, D2 — 21.74%, D1 — 18.84%, C2 — 5.8%. The high variability in the S, C, P regions of the virus genome in the examined group was shown. In all cases of HBsAg-negative chronic HBV infection identified in blood donors, viral sequences contained at least one amino acid substitution in positions, mutations in which are associated with immune escape. In 3 (4.35%) cases mutations in reverse transcriptase region of P gene that are associated with resistance to the following drugs were identified: lamivudine, telbivudine, entecavir. Mutations in the preCore/Core regions that contribute to the progression of liver disease were also identified.

Conclusion. Occult HBsAg-negative chronic HBV infection poses a threat of HBV transmission through transfusion of blood and its components due to the extremely low viral load, which does not allow the virus to be detected using routinely used diagnostic kits. The situation can be exacerbated by the abundance and diversity of virus amino acid substitutions that we have identified, including immune escape mutations, drug resistance mutations, and mutations that contribute to the progression of the disease.

Keywords: hepatitis B virus, occult hepatitis B, serological markers, molecular biological markers, HBV variability, genotypes, clinically significant mutations, 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 St. Petersburg Pasteur Institute (protocols No. 67, February 22, 2017 and No. 97, January 29, 2020).

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

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

For citation: Ostankova Yu.V., Serikova E.N., Semenov A.V., Zueva E.B., Valutite D.E., Schemelev A.N., Zurochka V.A., Totolian A.A. Molecular and genetic characterization of the hepatitis B virus full-length genome sequences identified in HBsAg-negative blood donors in Ural Federal District. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(6):637–650.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-325>

Введение

Вирус гепатита В (ВГВ) — ДНК-содержащий гемоконтактный патоген, способный вызывать как острое, так и хроническое заболевание печени, приводящее к развитию цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК). По оценкам Всемирной организации здравоохранения, на конец 2019 г. более чем у 296 млн человек в мире зарегистрирован хронический вирусный гепатит В (ХВГВ), смертность от связанных с инфекцией ВГВ случаев за год превысила 820 тыс. человек, однако осведомлены о своем заболевании были только 10,5% инфицированных¹.

Частично двуцепочечный кольцевой геном вируса протяженностью приблизительно 3200 нуклеотидов (нт) представлен генами *S*, *P*, *C* и *X*, кодирующими, за счёт перекрывающихся открытых рамок считывания, 7 белков.

Благодаря наличию в жизненном цикле РНК-стадии и отсутствию 3'-5'-экзонуклеазной активности обратной транскриптазы, что лишает вирус возможности корректировки генома, а также высокой скорости изменчивости, ВГВ характеризуется значительной генетической гетерогенностью [1]. Классифицируют ВГВ на основе дивергенции нуклеотидных последовательностей полного генома. В настоящее время описаны 9 генотипов (A–I), расхождение которых превышает 8%, и почти 50 субгенотипов, отличающихся друг от друга на 4,0–7,5% [2, 3]. Высокая степень генетической изменчивости позволяет вирусу реагировать на эндогенное и экзогенное селективное давление путём активной модификации структуры своего генома, что приводит к большому количеству естественно возникающих мутаций, часть из которых имеет клиническое значение. Так, в области гена *S* нередко выявляют аминокислотные замены в положениях 123, 126, 129, 130, 133, 144, 145 и 181, приводящие к ускользанию от иммунного ответа и/или к неэффективности диагностических тестов на HBsAg, а мутации в гене *P*, частично пересекающемся с геном *S*, способствуют устойчивости вируса к лекарственной терапии [4, 5]. Для региона гена *C* описаны мутации в промоторе *T1753C*, *A1762T/G1764A*, а также *F24Y*, *E64D*, *E77Q*, *A80I/T/V*, *L116I*, *E180A*, ассоциированные с прогрессированием заболевания печени и ГЦК [6].

Характеристика генотипических и мутационных профилей ВГВ в ключевых потенциально способствующих распространению вируса группах населения эпидемиологически значима для оценки моделей, путей передачи ВГВ, а также внедрения в популяцию импортированных штаммов [7]. Одной из таких ключевых групп являются доноры крови. Переливание крови и её продуктов играет важную роль в терапии тяжёлых состояний различного генеза, ежегодно спасая миллионы жизней во всем мире, однако трансфузиологические манипуляции при отсутствии достаточного контроля безопасности материала могут становиться источником инфицирования реципиентов гемоконтактными патогенами, включая вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), ВГВ и вирус гепатита С (ВГС).

В России, как и во многих странах, на протяжении многих лет основным диагностическим инструментом для выявления острой или хронической инфекции было определение поверхностного антигена ВГВ (HBsAg) серологическими методами; в случае получения сомнительных результатов по HBsAg дополнительно определяют антитела к ядерному антигену анти-HBscore IgG. В настоящее время в протокол обследования доноров входят молекулярно-биологические исследования для идентификации ДНК вируса, однако при этом допускается проведение анализа в миниупле (не более чем из 6 образцов) при чувствительности используемых наборов реагентов 100 МЕ/мл².

Несмотря на принятые меры в области инфекционной безопасности донорства крови, остаточный риск трансфузионной передачи ВГВ сохраняется³. Связано это, помимо случаев серонегативного окна после недавнего заражения, с двумя особенностями ВГВ. Во-первых, в то время как для заражения ВИЧ и ВГС необходима высокая вирусная нагрузка патогенов, инфекционная доза ВГВ составляет 16

¹ ВОЗ. Гепатит В. Основные факты. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>

² Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 28.10.2020 № 1166н «Об утверждении порядка прохождения донорами медицинского обследования и перечня медицинских противопоказаний (временных и постоянных) для сдачи крови и (или) ее компонентов и сроков отвода, которому подлежит лицо при наличии временных медицинских показаний, от донорства крови и (или) ее компонентов». URL: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001202011260032>

³ WHO. Global hepatitis report 2017: executive summary; 2017. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/global-hepatitis-report-2017>

копий (3 МЕ/мл), независимо от объёма переливаемой плазмы/компонентов крови [8]. Во-вторых, естественной формой течения ХВГВ является так называемый скрытый ВГВ (скВГВ), определяемый наличием способной к репликации ДНК вируса в тканях печени (эписомальной ковалентно замкнутой кольцевой ДНК) и/или в крови при отрицательном результате теста на HBsAg. Серопозитивный вариант скВГВ сопровождается наличием иных маркеров ХВГВ, в первую очередь антителами анти-HBcore, а при серонегативном могут полностью отсутствовать любые маркеры. Кроме того, преобладающая в большинстве таких случаев крайне низкая вирусная нагрузка усложняет задачу выявления ДНК ВГВ методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) [9]. В условиях переливания крови желательнее применять модификации ПЦР с чувствительностью 10 МЕ/мл и ниже, проводя индивидуальное тестирование образцов. Анализ с использованием минипулов, т.е. смеси 6–10 донаций, что нередко применяется для удешевления скрининга, приводит к снижению чувствительности в соответствии с коэффициентом разбавления, не позволяя выявлять случаи с низкой вирусной нагрузкой. При математическом моделировании рассчитанная оценка остаточного риска ВГВ варьирует от < 1 до 1,4 на 1 млн донаций в странах с низкой эндемичностью ВГВ и от 16 до > 100 в странах с высокой эндемичностью [10].

Исследования распространённости скВГВ среди доноров крови долгое время были немногочисленны, однако в последние годы появляется всё больше публикаций, посвящённых этой проблеме. Встречаемость этой формы ХВГВ среди доноров крови в разных странах варьирует в зависимости от представленности HBsAg в географическом регионе. Так, среди доноров крови в Аргентине ВГВ был выявлен только в 0,06% образцов, из них только 4 образца были HBsAg-негативными. Напротив, в Лаосской Народно-Демократической Республике и Нигерии распространённость скВГВ составила 10,9 и 17% соответственно [11, 12]. В то же время зарегистрированная распространённость скВГВ среди доноров крови нередко колеблется в пределах одного и того же региона, а результаты разных исследовательских коллективов противоречивы. Например, в Иране встречаемость HBsAg у населения и у доноров крови составляет 2,6 и 0,4%, соответственно, при этом распространённость скВГВ среди доноров превышает 4% [13–15]. Таким образом, данные в целом варьируют в зависимости не только от региона, но и от методов определения вируса, включая разнообразие коммерческих наборов для выявления HBsAg и ДНК ВГВ.

Поскольку генетическое разнообразие вирусов демонстрирует пространственно-временные вариации, а генетический профиль изолятов в ключевых группах, потенциально способных становиться

источником распространения патогена, важен для прогнозирования эпидемиологической ситуации, представляется значимым определить циркулирующие в настоящее время генотипы ВГВ среди регулярных доноров крови в регионах Российской Федерации.

Целью нашей работы было дать молекулярно-генетическую характеристику геномов ВГВ, выявленных у HBsAg-негативных доноров крови в Уральском федеральном округе.

Материалы и методы

В работе были использованы 1400 образцов плазмы донорской крови, полученных в 2020 г. от HBsAg-негативных регулярных доноров крови Уральского федерального округа. Все обследованные дали письменное информированное согласие на участие в исследовании. На проведение данного исследования было получено одобрение локального этического комитета Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (протоколы № 67 от 22.02.2017 и № 97 от 29.01.2020). Непосредственно в медицинских учреждениях, осуществлявших сбор и банкирование крови и её элементов, образец от каждой донации исследовали на маркеры 4 гемотрансмиссивных инфекций: ВИЧ (антиген p24 ВИЧ-1, антитела к ВИЧ-1/2), ВГВ (HBsAg, ДНК ВГВ в минипулах), ВГС (антитела к ВГС, РНК ВГС в минипулах), сифилис (антитела класса М и G к бледной трепонеме). В Санкт-Петербургском НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера исследование поступившей плазмы на наличие серологических маркеров ХВГВ методом иммуноферментного анализа заключалось в качественном определении HBsAg, антител анти-HBs IgG, анти-HBcore IgG. Анализы проводили в 2 повторах с использованием коммерческих наборов «ДС-ИФА-HBsAg», «ДС-ИФА-АНТИ-HBsAg», «ДС-ИФА-АНТИ-HBc» (НПО «Диагностические системы») и «Вектогеп В-HBs-антиген», «ВектоHBsAg-антитела», «ГепаБест анти-HBc-IgG» (АО «Вектор-Бест») согласно инструкциям производителя. Для определения HBsAg использовали наборы реагентов с чувствительностью 0,05 и 0,01 МЕ/мл.

Экстракцию ДНК ВГВ осуществляли с использованием коммерческого набора «РИБО-преп» (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора). Предварительно для всех образцов проводили концентрирование вирусных частиц ультрацентрифугированием плазмы крови в течение 1 ч при 24 000g и 4°C.

Для первичного выявления ВГВ методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» применяли коммерческий диагностический набор реагентов «АмплиСенс® HBV-FL» (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) согласно инструкции. Чувствительность набора реагентов составляет 50 МЕ/мл.

Таблица 1. Распространённость и распределение серологических маркеров ВГВ в обследованной группе, *n* (%; 95% ДИ)
Table 1. Prevalence and distribution of the hepatitis B serological markers in the examined group, *n* (%; 95% CI)

Выявленные серологические маркеры в плазме крови Detected serological markers in blood plasma	Численность в группе Number in the group (<i>n</i> = 1400)	Численность в группе среди мужчин Number in the group among men (<i>n</i> = 936)	Численность в группе среди женщин Number in the group among women (<i>n</i> = 464)
Распространённость серологических маркеров Prevalence of the hepatitis B serological markers			
HBs IgG+	947 (67,64; 65,12–70,09)	631 (67,41; 64,31–70,41)	316 (68,1; 63,65–72,32)
HBcore IgG+	172 (12,29; 10,61–14,12)	137 (14,64; 12,43–17,07)	40 (8,62; 6,23–11,55)
Серопозитивные Seropositive	1018 (72,71; 70,3–75,03)	690 (73,72; 70,77–76,51)	328 (70,69; 66,32–74,8)
Серонегативные Seronegative	382 (27,29; 24,97–29,7)	246 (26,28; 23,49–29,23)	136 (29,31; 25,2–33,68)
Распределение серологических маркеров Distribution of serological markers			
HBcore IgG+, HBs IgG+	101 (7,21; 5,91–8,79)	73 (7,8; 6,16–9,71)	28 (6,03; 4,05–8,6)
HBcore IgG+ изолированные isolated	71 (5,07; 3,98–6,35)	59 (6,3; 4,83–8,06)	12 (2,59; 1,34–4,47)
HBs IgG+ изолированные isolated	846 (60,43; 57,81–63,00)	558 (59,62; 56,39–62,78)	288 (62,07; 57,48–66,5)

Дальнейшее определение ДНК ВГВ проводили с использованием разработанной в Санкт-Петербургском НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера методики, позволяющей выявлять ДНК ВГВ в биологическом материале при низкой вирусной нагрузке (чувствительность составляет 5 МЕ/мл), в том числе при HBsAg-негативном ХВГВ [16]. Для всех выявленных образцов проводили секвенирование и последующий анализ нуклеотидных последовательностей полных геномов ВГВ, как описано ранее [17].

Первичный анализ полученных в ходе секвенирования фрагментов осуществляли с помощью программы NCBI Blast в сравнении с нуклеотидными последовательностями, представленными в международной базе данных GenBank. Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили в программе MEGA11, используя алгоритм ClustalW [18]. Для построения филогенетических деревьев и последующего филогенетического анализа рассматривали расстояния между последовательностями методом присоединения соседей, позволяющим оптимизацию дерева в соответствии с критерием «сбалансированной минимальной эволюции» (neighbor-joining), для оценки достоверности построенных деревьев проведён бутстреп (bootstrap) для 1000 повторов.

Серологический подтип ВГВ определяли на основе аминокислотной последовательности HBsAg.

Полученные последовательности ВГВ также были проанализированы для определения их генотипов и оценки возможной лекарственной устойчивости и мутаций, ускользающих от иммунитета, с использованием 3 онлайн-инструментов базы данных Geno2Pheno HBV⁴, программы HBVseq⁵

из базы данных HIV Stanford, инструмента HIV-GRADE HBV⁶.

Статистическую обработку данных производили с помощью пакета программ «MS Excel», «Prizm 5.0» («GraphPad Software Inc.»). При оценке статистической погрешности использовали «точный» интервал Клоппера–Пирсона. Результаты представлены с указанием 95% доверительного интервала (ДИ). Для оценки достоверности различий численных данных, полученных при парных сравнениях, использовали, в зависимости от характеристик выборок, точный критерий Фишера или критерий χ^2 с поправкой Йетса. В качестве порога достоверности отличий было определено значение вероятности $p < 0,05$.

Результаты

Возраст доноров крови в группе варьировал от 18 лет до 61 года и в среднем составил $33,5 \pm 8,7$ года. Количество мужчин в обследуемой группе преобладало по сравнению с женщинами — 66,85 и 33,14% соответственно.

Распространённость серологических маркеров в группе составила 72,71% (95% ДИ 70,30–75,03%). Не выявлено различий в общей распространённости маркеров ВГВ у мужчин (73,72%; 95% ДИ 70,77–76,51%) и женщин (70,69%; 95% ДИ 66,32–74,8%). Результат анализа распространённости и распределения исследованных маркеров ВГВ в обследованной группе представлен в табл. 1.

Таким образом, серологические маркеры ХВГВ в целом представлены у мужчин и женщин в равной степени, однако антитела анти-HBcore IgG чаще выявляли у мужчин по сравнению с женщинами ($\chi^2 = 10,166$; $p = 0,0014$; df (число степеней свободы) = 1). При оценке распределения маркеров изолированные антитела анти-HBcore IgG также

⁴ URL: <https://hbv.geno2pheno.org>

⁵ URL: <https://hivdb.stanford.edu/HBV/HBVseq/development/HBVseq.html>

⁶ URL: <https://www.hiv-grade.de/cms/grade/explanations/hbv-tool>

чаще выявляли у мужчин, чем у женщин ($\chi^2 = 8,904$; $p = 0,0028$; $df = 1$).

В пределах серопозитивной группы мужчин (67,78%; 95% ДИ 64,81–70,64%) больше, чем женщин (32,22%; 95% ДИ 29,36–35,19%). Результат анализа распространённости и распределения исследованных маркеров ВГВ в группе серопозитивных лиц представлен в **табл. 2**.

При оценке распространённости серологических маркеров по возрастным группам выявлено, что среди ВГВ-серопозитивных лиц 9,14% (95% ДИ 7,44–11,07%) — люди в возрасте 18–22 лет, 55,89% (95% ДИ 52,78–58,97%) — 23–40 лет и 34,97% (95% ДИ 32,04–37,99%) — старше 40 лет.

При использовании молекулярно-биологических методов ДНК ВГВ выявлена у 4,93% (95% ДИ 3,85–6,20%) доноров крови. Среди анти-НВcore IgG-позитивных образцов ДНК ВГВ обнаружили в 18,08% (95% ДИ 12,71–24,55%) образцов, в то время как у лиц с выявленной ДНК ВГВ анти-НВcore IgG — в 46,38% (95% ДИ 34,28–58,8%). Определены 8,69% (95% ДИ 3,26–17,97%) изолятов, у которых обнаруживали одновременно антитела анти-НВs IgG и ДНК вируса при отсутствии анти-НВcore IgG. Подчеркнём, что, несмотря на значимое преобладание мужчин в группе доноров крови и среди лиц с выявленной ДНК ВГВ (75,36%; 95% ДИ 63,51–84,94%), представленность скВГВ среди мужчин (5,56%; 95% ДИ 4,18–7,22%) преобладала по сравнению с женщинами (3,66%; 95% ДИ 2,15–5,8%) незначительно, достоверных отличий не установлено ($p = 0,1488$).

Вирусная нагрузка в большинстве образцов (94,2%) составила менее 50 МЕ/мл, однако в 4 случаях достигала 10^5 МЕ/мл.

Нуклеотидные последовательности полных геномов выявленных изолятов ВГВ депонированы в международную базу данных GenBank под номерами OR153940–OR154008.

На основании филогенетического анализа 69 изолятов показано, что в обследованной груп-

пе преобладал ВГВ генотипа D (94,2%; 95% ДИ 85,82–98,4%), в 4 случаях выявлен генотип C (5,8%; 95% ДИ 1,60–14,18%). При этом среди пациентов с ВГВ генотипа D наиболее высокая частота встречаемости определена для субгенотипа D3 (56,92%) по сравнению с субгенотипами D2 (23,08%) и D1 (20%). Таким образом, среди 69 образцов у НВsAg-негативных доноров крови представлены субгенотипы ВГВ в следующих соотношениях: D3 — 53,62%, D2 — 21,74%, D1 — 18,84%, C2 — 5,8% (**рисунок**).

При определении серологического подтипа обнаруженных изолятов преобладал серотип ауw2 (73,91%; 95% ДИ 61,94–83,75%), в меньшей степени представлены серотипы ауw3 (14,49%; 95% ДИ 7,18–25,14%), adw3 и adr — по 5,8% (95% ДИ 1,60–14,18%). При этом серотип ауw2 установлен для всех изолятов субгенотипа D1 и для большинства D2 и D3, ауw3 также указан для D2 и D3, adw3 определён только для ВГВ субгенотипа D2, adr для C2.

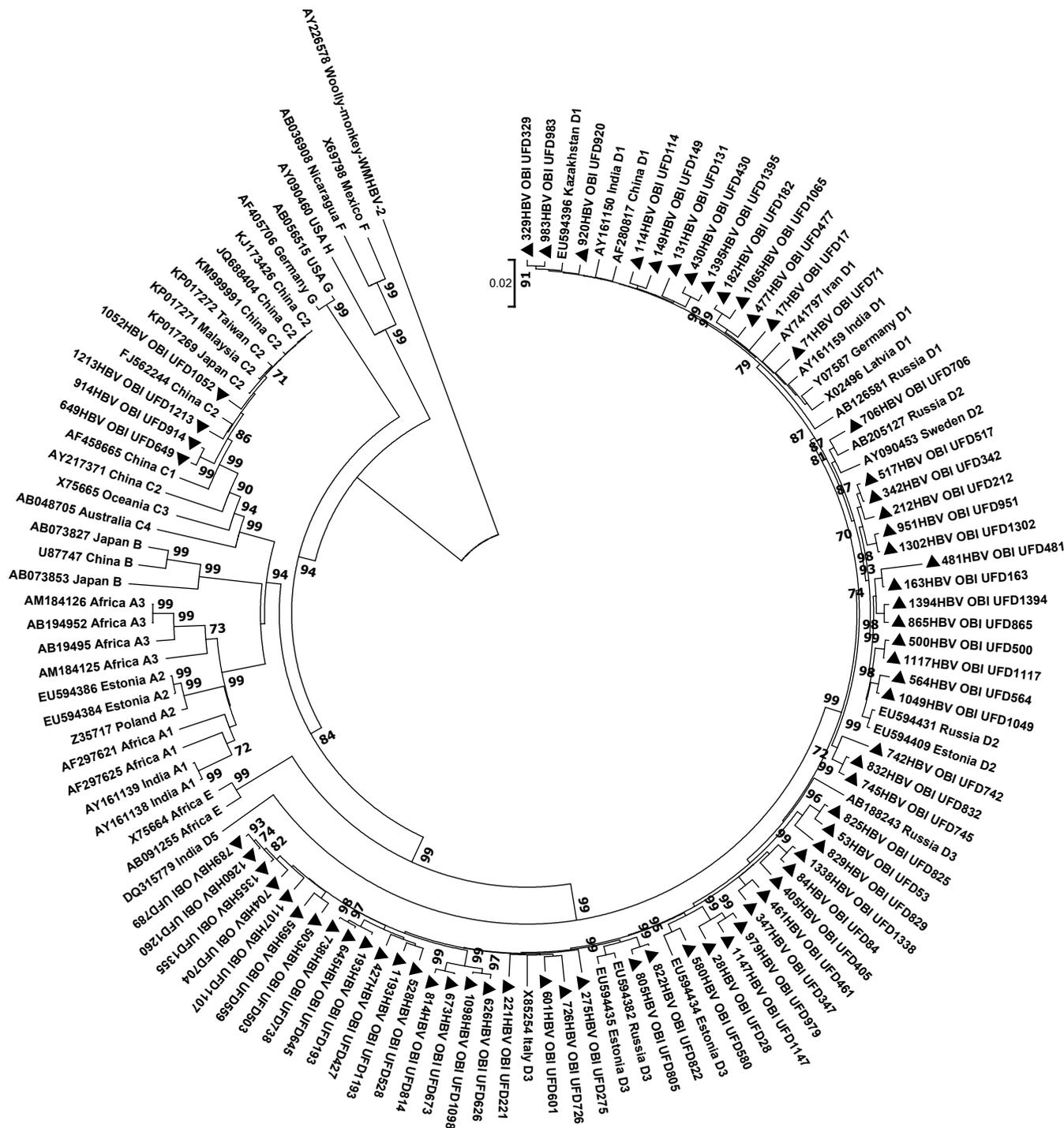
Несмотря на то что в большинстве случаев нуклеотидные последовательности ВГВ при скрытой форме ХВГВ не имеют отличий от таковых при НВsAg-позитивном заболевании и определяются как «дикий тип», в обследуемой группе доноров выявлен ряд естественных полиморфных вариантов вируса в регионах генома всех изолятов, в том числе аминокислотные замены показаны для 100% образцов ВГВ в регионах RT, SHB, MNB, LNB и Core, а также для 71,01% в регионе preCore.

Для изучения мутаций, влияющих на антигенность НВsAg, проанализирован регион главной гидрофильной области (Major Hydrophilic Region — MHR) и регион детерминанты «а», представляющей собой кластер основных эпитопов В-клеток, расположенных между 124 и 147 (или 149) аминокислотными остатками. Показано наличие аминокислотных замен в 22 позициях из 144, что составило 15,28% (95% ДИ 9,83–22,21%). Выявили следующие полиморфные варианты: Y100S/L, Q101R/H, G102R, L109Q/L, I110L, G112E, T113S,

Таблица 2. Распространённость и распределение серологических маркеров ВГВ среди серопозитивных лиц, n (%; 95% ДИ)

Table 2. Prevalence and distribution of the hepatitis B serological markers among seropositive individuals, n (%; 95% CI)

Выявленные серологические маркеры в плазме крови Detected serological markers in blood plasma	Численность в серопозитивной группе Number in the seropositive group ($n = 1018$)	Численность в серопозитивной группе среди мужчин Number in the seropositive group among men ($n = 690$)	Численность в серопозитивной группе среди женщин Number in the seropositive group among women ($n = 328$)
Распространённость серологических маркеров Prevalence of the hepatitis B serological markers			
НВs IgG+	947 (93,03; 91,28–94,51)	631 (91,45; 89,11–93,43)	316 (96,34; 93,7–98,1)
НВcore IgG+	172 (16,9; 14,64–19,34)	137 (19,86; 16,94–23,03)	40 (12,19; 8,86–16,23)
Распределение серологических маркеров Distribution of serological markers			
НВcore IgG+, НВs IgG+	101 (9,92; 8,15–11,92)	73 (10,58; 8,38–13,12)	28 (8,54; 5,75–12,10)
НВcore IgG+ изолированные isolated	71 (6,97; 5,49–8,72)	59 (8,55; 6,57–10,89)	12 (3,66; 1,9–6,3)
НВs IgG+ изолированные isolated	846 (83,1; 80,66–85,36)	558 (80,87; 77,73–83,74)	288 (87,8; 83,77–91,14)



Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей полных геномов ВГВ, выделенных от доноров крови в сравнении с представленными в международной базе данных GenBank референсными последовательностями.

Референсные последовательности обозначены кодами GenBank с указанием генотипа и региона происхождения образца. Как внешняя группа использована нуклеотидная последовательность ВГВ шерстистой обезьяны AY226578. Исследованные в настоящей работе образцы обозначены чёрными треугольниками. Для построения филогенетического дерева использовали алгоритм присоединения соседей (neighbor-joining). Даны значения bootstrap ≥ 60.

Phylogenetic analysis of the HBV complete genomic nucleotide sequences from blood donors compared to reference sequences from the GenBank international database.

The reference sequences have the assigned GenBank codes showing the genotype and the region of the sample. Nucleotide sequence AY226578 of woolly monkey HBV was used as an out-group. The studied samples are marked with black triangles. The phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method. Bootstrap values ≥ 60 are used.

T114S, T118V/A, P120S, K122R, T125M, T127P, A128V, N131T, S132Y, F134Y, A159G, Y161F, V168A. Во всех изолятах ВГВ генотипа С в указанном регионе определены замены, не обнаруженные среди изолятов генотипа D: *T126I, K160R.*

В регионе обратной транскриптазы гена *P* также выявлен ряд полиморфных вариантов: *A7V, E11G, H12L, I16T, A21S, A38G/E, R41G, Q48E, Y54H/N/D, V63I/C/G, N71K, L72R, N76T/G, S85C/L, F88S, Y89*/L, H90S, L91I, H94D, A97G, H100D, S105C, Y111N, S117Y, N118T, F122L, H124Y/N/H, H126R, T128I/N/T/A, M129L, Q130P, D134N, Y135S, N139D, L145M, K154Q, L164M, R167G, L180M, T184A, I187L, M204V, S213T, V214A, H216Q, L229F, A223S, N248H, C256S, Y257H, D263E/A, I266V/R, Q267H/L, E271D, V278I, I282V, L293H, F300L, M309K, S317A/F/S, K318R, A329T, N337T.* При этом у большинства обследуемых (21,74%; 95% ДИ 23,71–33,31%) показаны по 7 мутаций в RT-регионе, у 15,94% (95% ДИ 8,24–26,74%) — по 6 мутаций, у 11,59% (95% ДИ 5,14–21,57%) — по 10 и более мутаций, у 11,59% (95% ДИ 5,14–21,57%) — по 8 мутаций, у 10,14% (95% ДИ 4,18–19,79%) — по 3 и 4 мутации, у 8,7% (95% ДИ 3,26–17,97%) — по 5 мутаций, у 7,25% (95% ДИ 2,39–16,11%) — по 9 мутаций. В 3 случаях (4,35%; 95% ДИ 0,91–12,18%) были определены мутации устойчивости вируса к лекарственным препаратам (табл. 3).

При анализе *preCore*-региона выявляли полиморфные варианты *W28L/S, G29D/A.* Частота встречаемости *W28L/S* составила 13,04% (95% ДИ 6,14–23,32%), *G29D/A* — 23,19% (95% ДИ 13,87–34,91%), 2 мутаций одновременно — 5,8% (95% ДИ 1,60–14,18%).

Непосредственно в регионе *Core* определены 39 позиций, в которых происходили аминокислотные замены: *T12S, S21T/H/A/Q, F24Y, V27I, D29Q, A34T, E40D/Q, A41P, P45H, L55I, E64D, M66L/R, T67N/S, A69V/S, N74G/V, E77D, P79Q, A80I/T, N87S,*

N92H, I97F/L, I105V, T109S, E113Q/D, L116V/I, P130A, A131T, P135Q, N136D, T142L, L143I, T147A, V149I, R151P, D153, R154*, S157T, Q179K, S183P.*

Обсуждение

В 2016–2017 гг. в России зарегистрировано 2643 случая острого ВГВ (ОВГВ) — 0,915 на 100 тыс. населения, что отражает снижение заболеваемости за последние 5 лет в 1,6 раза. Распределение частоты заболеваемости в субъектах страны неравномерно, варьирует от 0–0,54 до 0,86–3,79 на 100 тыс. населения. Однако продолжает регистрироваться достаточно высокая заболеваемость впервые выявленным ХВГВ — приблизительно 21,045 случая на 100 тыс. населения с учётом больных ХВГВ и пациентов, которых ранее обозначали как «носители ВГВ». Такое противоречие в заболеваемости ОВГВ и ХВГВ связано, по всей видимости, с несколькими факторами. Прежде всего, инфицирование ВГВ преимущественно происходит бессимптомно, т.е. выявленные случаи острого течения заболевания составляют лишь некий процент от реального уровня частоты заражения. Второй причиной остается сравнительно низкая информированность населения и ограниченная доступность сложных молекулярно-генетических методов диагностики, в результате чего новые случаи ХВГВ выявляют либо случайно, например, при общей диспансеризации, либо при обращении к врачам пациентов с выраженными клиническими симптомами серьёзных стадий заболевания. Очевидно, что такие обнаруженные новые случаи фактически не являются новыми, а также составляют лишь некоторую долю от истинно больных ХВГВ. Уральский федеральный округ относится к регионам с самой высокой заболеваемостью ОВГВ — 0,86–3,79 на 100 тыс. населения и с крайне вариабельной заболеваемостью ХВГВ: от 0,26–7,66 в Курганской, Свердловской и Тюменской областях до 11,63–61,72

Таблица 3. Мутации лекарственной устойчивости, выявленные в обследуемой группе

Table 3. Drug resistance mutations identified in the study group

Изолят Isolate	Генотип Subgenotype	Мутация Mutation	Описание Description
HBV_OBI_UFD53	D1	<i>M204V</i>	Резистентность к ламивудину, телбивудину, частичная резистентность к энтекавиру Resistance to lamivudine, telbivudine, partial resistance to entecavir
HBV_OBI_UFD1147	D2	<i>L180M</i>	Ограниченная чувствительность к ламивудину Limited sensitivity to lamivudine
		<i>T184A, L180M</i>	Компенсаторная мутация при резистентности к энтекавиру Compensatory mutation in entecavir resistance
HBV_OBI_UFD829	D2	<i>L180M, M204V</i>	Резистентность к ламивудину Resistance to lamivudine
		<i>M204V</i>	Резистентность к телбивудину Resistance to telbivudine
		<i>T184A, L180M, M204V</i>	Резистентность к энтекавиру Resistance to entecavir

в Ямало-Ненецком автономном округе [19]. В связи с вышесказанным Уральский федеральный округ был выбран в качестве одного из первых регионов для пилотного исследования распространённости скВГВ среди доноров крови в России.

Отсутствие HBsAg в обследуемой группе соответствует информации, полученной от медицинских учреждений, предоставивших биологический материал. Высокий уровень анти-HBs IgG связан, по всей видимости, с вакцинацией против вируса. Выявленные случаи сочетания анти-HBs IgG и анти-HBcore IgG свидетельствуют о том, что 7,21% доноров сохраняли определяемые уровни нейтрализующих антител после заражения и естественного выздоровления. Преобладание мужчин среди серопозитивных лиц связано, видимо, с общим преобладанием мужчин в обследуемой группе, что подтверждает сходство распространённости маркеров ХВГВ среди мужчин и женщин. Более низкая встречаемость анти-HBcore IgG у женщин по сравнению с мужчинами может свидетельствовать о сравнительно менее рисковом поведении представительниц этой когорты, а значит, и меньшей вероятности инфицирования.

Общеизвестно, что распространённость ВГВ оценивают по встречаемости HBsAg и, соответственно, выделяют географические регионы с высоким (> 8%), умеренным (2–7%) и низким (< 2%) уровнями распространённости инфекции среди населения. Россия в целом относится к странам с умеренной распространённостью. Однако такой метод не позволяет учитывать распространённость скрытой, HBsAg-негативной формы заболевания. Выявление в рамках нашего исследования 4,93% доноров ДНК ВГВ свидетельствует о недостаточности применяемых в настоящее время методов для скрининга доноров крови на маркеры ВГВ. Отсутствие достоверных отличий в частоте встречаемости ДНК ВГВ у мужчин и женщин не позволяет рассматривать мужской пол как фактор риска для развития скВГВ, несмотря на то что беспорядочные половые связи и иные варианты рискованного поведения в большей степени характерны для мужского пола. Ранее, оценивая распространённость HBsAg-негативного ХВГВ у доноров крови в Казахстане, мы также отмечали отсутствие достоверных отличий и лишь некоторую тенденцию к более частому инфицированию мужчин (10,1%) по сравнению с женщинами (6,9%) [20]. Напротив, у доноров крови в Гвинейской Республике встречаемость ДНК ВГВ у мужчин (18,61%) достоверно превышала таковую у женщин — 10,5% ($\chi^2 = 27,285$; $p < 0,0001$; $df = 1$) [21]. Можно предположить, что в наличии или отсутствии отличий могут играть роль как распространённость патогена в регионе, так и разница в особенностях поведения мужчин и женщин в России, Казахстане и Гвинее.

Отметим, что, с одной стороны, выявление только 18,08% случаев ДНК ВГВ среди всех положительных по анти-HBcore IgG доноров свидетельствует об избыточности указанного серологического маркера при диагностике. С другой стороны, только у 46,38% ДНК ВГВ-позитивных лиц обнаруживали анти-HBcore IgG, что, в свою очередь, демонстрирует недостаточность тестирования на анти-HBcore IgG для обнаружения всех доноров со скВГВ. Отдельного внимания заслуживают случаи выявления ДНК ВГВ у доноров с сочетанием антител анти-HBs IgG и анти-HBcore IgG, а также у лиц только с анти-HBs IgG. Ранее такое явление описывали преимущественно у больных с иммуносупрессией различного генеза, однако обнаруживали также и у иммунокомпетентных доноров крови. Так, среди HBsAg-негативных доноров крови с ДНК ВГВ в Китае 85% были реактивными в отношении анти-HBcore, 36,2% — анти-HBc и анти-HBs, 11,3% не имели серологических маркеров [22]. Ввиду того, что такой серологический профиль у лиц с HBsAg-негативной формой ХВГВ более распространён в странах Азии (13%), чем в Европе (2%), высказано предположение о его взаимосвязи с недостаточным охватом вакцинацией [10].

Растущая чувствительность ПЦР-методов, направленная на выявление ВГВ при крайне низкой вирусной нагрузке, потенциально способна приводить к появлению ложноположительных ответов. Из-за расхождения результатов анализа между серологическими и высокочувствительными молекулярно-генетическими тестами при скВГВ представляется затруднительным различать истинные и ложноположительные случаи обнаружения ДНК вируса. В связи с вышесказанным секвенирование нуклеотидных последовательностей всех выявленных изолятов является убедительным способом подтверждения HBsAg-негативного ХВГВ.

Генотипический профиль ВГВ в обследуемой группе имеет несколько особенностей. Так, ранее для Уральского федерального округа описывали только генотип D, что схоже с полученными нами результатами, в то время как для России в целом характерно преобладание генотипа D, но также распространённость генотипа A субгенотипа A2 и генотипа C субгенотипа C1 [23]. Однако в то время, как для центральной и северо-западной части страны характерен ВГВ субгенотипа D2, в настоящем исследовании ведущую роль играет субгенотип D3, тогда как D2 незначительно превышает по частоте встречаемости D1. Авторы считают, что такое распределение субгенотипов генотипа D обусловлено близким соседством с Казахстаном и значительным количеством мигрантов из указанного региона, встречаемость в котором ВГВ D3 и D1 крайне высока [24]. Кроме того, известно, что преобладание ВГВ D3 типично в группах пациентов, сообщавших

о рискованном сексуальном поведении, тогда как множественность вариантов вируса описана для когорт, представленных людьми, считающими, что инфицирование произошло во время медицинских манипуляций [25]. Полученные результаты в целом могут служить дополнительным свидетельством изменения эпидемиологического профиля ВГВ в России за счёт трудовой миграции из стран Средней Азии. Разнообразие геновариантов вируса в пределах субгенотипов указывает на множественность независимых источников инфицирования выявленных случаев генотипа D в обследованной группе. Особого внимания заслуживают 4 изолята субгенотипа C2, практически не представленного на территории нашей страны, выделенные от мужчин в возрасте 25–30 лет, проживающих в одном городе и не являющихся родственниками. Для лучшей дифференциации полученных изолятов мы выбрали в международной базе данных GenBank 8 полных геномов ВГВ субгенотипа C2, наибольшее сходство с которыми было показано для наших образцов. Однако при филогенетическом анализе выявленные нами изоляты не образовали монофилетической клады, связанной с какой-либо референсной последовательностью. В связи с вышесказанным, несмотря на анамнестические данные доноров крови, авторы предполагают как минимум 2 независимых случая завоза в регион указанного субгенотипа.

Как известно, антигенную специфичность характеризуют серотипы, определение которых нередко осуществляют параллельно с генотипированием, поскольку, по некоторым данным, клиническое течение ХВГВ может быть связано с генотипом и серотипом вируса [26]. В России серотипы ауw2 и ауw3 типичны для изолятов генотипа D, что в целом согласуется с полученными нами результатами. Однако 4 случая серотипа адw3 изолятов D2 могут быть связаны с мутациями детерминанты «а», третичная структура которой способна определять антигенную специфичность [27]. В большинстве случаев ХВГВ, выявленных нами в группе доноров, вирусная нагрузка крайне низка и только в указанных образцах достигала 10^5 МЕ/мл, что позволило предположить ложный скВГВ, характеризующийся достаточно высокой вирусной нагрузкой и модифицированным HBsAg, отсутствие которого при тестировании связано с неэффективностью диагностических наборов.

В качестве профилактики заражения ВГВ доступна безопасная и эффективная вакцина, обеспечивающая 98–100% защиты от вируса, предотвращающая развитие осложнений, включая хроническое заболевание и первичный рак печени. Однако некоторые мутации, возникающие в геноме вируса как естественным образом, так и под селективным действием внешних факторов, могут приводить к избеганию терапевтических, профилактических

и диагностических мероприятий. Основной белок оболочки ВГВ состоит из N-конца (положения аминокислот 1–99), MHR (положения аминокислот 100–169) и C-конца (положения аминокислот 170–226). Главный гидрофильный регион включает 2 петли, связанные дисульфидными мостиками между cys124–cys137 и cys139–cys147, и является мишенью антител, индуцированных иммунизацией и используемых в диагностических анализах [28]. Разрушение мостиков за счёт возникающих мутаций приводит к изменению конформации белка и, как следствие, к невозможности нейтрализации вируса вакцинными антителами, а также к упомянутой нами выше неэффективности диагностических наборов из-за неспособности антител распознать модифицированный эпитоп [5]. Таким образом, в некоторых случаях профилактическое применение вакцин или иммуноглобулинов может оказаться неэффективным.

Все выявленные в настоящей работе изоляты несли аминокислотные замены в MHR, включая мутации, ассоциированные с HBsAg-негативным ХВГВ, а также ранее описанные как escape-мутации, или мутации вакцинного избегания [29]. Кроме того, некоторые из обнаруженных мутаций S-региона ассоциированы с прогрессированием заболевания печени. Например, согласно данным N. Thi Sam Huong и соавт., риск развития ГКЦ составил 3,38 при инфицировании вирусом с полиморфизмом *P120S* [30]. Особого внимания заслуживает тот факт, что во всех выявленных нами случаях скВГВ у доноров крови были представлены вирусы по крайней мере с 1 аминокислотной заменой в положениях 120, 126 и 131, мутации в которых действуют как ускользающие от вакцины. Данное обстоятельство, очевидно, может представлять опасность в связи с возможностью передачи патогена вакцинированным лицам. Кроме того, циркуляция в группе доноров крови изолятов с escape-мутациями является проблемой с точки зрения повышенного риска реактивации ВГВ у пациентов с ослабленным иммунитетом, что имеет особое значение при переливании крови и её компонентов [31].

В связи с вышесказанным вариабельность участка обратной транскриптазы гена *P* не удивительна; с другой стороны, аминокислотные замены в этом домене также могут приводить к низким уровням ДНК ВГВ и HBsAg. Выявленные мутации фармакорезистентности (*L180M*, *M204I*) и компенсаторная мутация *T184A* описаны у пациентов с коинфекцией ВИЧ + ВГВ и относятся к наиболее распространённым среди получающих антиретровирусную терапию лиц в европейском многоцентровом исследовании [32]. Обнаружение 3 случаев скВГВ, сочетающихся с мутациями ускользания мутации фармакорезистентности, представляет очевидную угрозу инфициро-

вания реципиентов устойчивым к терапии вирусом, обнаружение которого затруднено без использования сложных высокочувствительных молекулярно-биологических методов.

В нашей работе мутации в preCore-регионе были выявлены в 71% случаев, в то время как любые изменения в последовательности этого фрагмента потенциально могут служить маркерами прогрессирования заболевания. Так, полиморфизм позиций 28 и 29, обнаруженный нами, достоверно ассоциирован с развитием цирроза печени и ГЦК. Известно также, что стоп-кодон в положении 28 (*W28**) способен негативно влиять на синтез HBsAg, отвечая более чем за 90% случаев дефектной секреции указанного белка [6]. В настоящем исследовании мы не определили стоп-кодона, и можно предположить, что *W28L* и *W28S* являются переходным «этапом» к появлению мутации *W28**.

Среди общего разнообразия полиморфных вариантов в регионе Core выявлены ассоциированные с развитием заболевания печени мутации (например, *F24Y*, *E40D/Q*, *E77D*, *A80I/T*), локализованные, как известно, в районе эпитопов Т-клеток (*F24Y*, *E40D/Q*) и В-клеток (*E77D*, *A80I/T*, *L116V/I*) [33]. Модификации аминокислотной последовательности между позициями 113 и 143 влияют на антигенность и стабильность вируса. Теоретически мутации в основных иммунных эпитопах способны нарушить иммунный ответ, что приводит к персистирующей инфекции и, вероятно, может являться одной из причин развития скВГВ у обследованных доноров крови, а также разнообразия выявляемых у больных полиморфных вариантов во всех регионах генома вируса [34]. Полученные нами результаты согласуются с исследованиями М. Wang и соавт., определившими значительно большую вариабельность регионов генома *S*, включая MHR, и *P*, включая регион обратной транскриптазы, вируса при скВГВ по сравнению с HBsAg-положительной формой течения заболевания [35].

СкВГВ представляет собой угрозу передачи ВГВ при переливании крови и её компонентов, ситуация могут усугубить выявленные нами обилие и разнообразие аминокислотных замен вируса, включающих мутации иммунологического избегания, мутации фармакорезистентности и мутации, способствующие прогрессированию развития заболевания, цирроза и ГЦК. Следует также помнить, что значительную долю реципиентов составляют новорождённые и дети, в то время как при инфицировании ВГВ до 5 лет вероятность хронизации достигает 90%. Изучение характеристик полноразмерного генома ВГВ среди доноров крови из различных регионов будет способствовать пониманию ситуации с частотой встречаемости скВГВ среди доноров и значения HBsAg-негативного ХВГВ для распространения патогена в популяции.

Заключение

Высокая частота встречаемости скВГВ среди доноров крови свидетельствует не только о широком распространении HBsAg-негативной формы заболевания в популяции, но и о недостаточности общепринятых методов анализа и/или чувствительности диагностических тестов для выявления ХВГВ, требуя внимания и эффективных мер для обеспечения безопасного переливания крови. Выявленная гипервариабельность генома вируса убеждает в необходимости изучения отличительных черт патогена и иммунного ответа хозяина при скрытом течении ВГВ. Использование молекулярной филогенетики может способствовать пониманию эпидемиологии инфекционного процесса, выявлению особенностей распространения и роли «завозных» генотипов ВГВ в циркуляции вируса в регионе.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Lin Y.Y., Liu C., Chien W.H., Wu L.L., Tao Y., Wu D., et al. New insights into the evolutionary rate of hepatitis B virus at different biological scales. *J. Virol.* 2015; 89(7): 3512–22. <https://doi.org/10.1128/JVI.03131-14>
2. Kao J.H. Molecular Epidemiology of Hepatitis B Virus. *Korean J. Intern. Med.* 2011; 26(3): 255–61. <https://doi.org/10.3904/kjim.2011.26.3.255>
3. Lin C.L., Kao J.H. Hepatitis B virus genotypes and variants. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2015; 5(5): a021436. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021436>
4. Ye Q., Shang S.Q., Li W. A new vaccine escape mutant of hepatitis B virus causes occult infection. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2015; 11(2): 407–10. <https://doi.org/10.4161/21645515.2014.994461>
5. Xue Y., Wang M.J., Yang Z.T., Yu D.M., Han Y., Huang D., et al. Clinical features and viral quasispecies characteristics associated with infection by the hepatitis B virus G145R immune escape mutant. *Emerg. Microbes. Infect.* 2017; 6(3): e15. <https://doi.org/10.1038/emi.2017.2>
6. Yilm., Cortese M.F., Guerrero-Murillo M., Orriols G., Gregori J., Casillas R., et al. Conservation and variability of hepatitis B core at different chronic hepatitis stages. *World J. Gastroenterol.* 2020; 26(20): 2584–98. <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i20.2584>
7. Mixson-Hayden T., Lee D., Ganova-Raeva L., Drobeniuc J., Stauffer W.M., Teshale E., et al. Hepatitis B virus and hepatitis C virus infections in United States-bound refugees from Asia and Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2014; 90(6): 1014–20. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0068>
8. Candotti D., Assennato S.M., Laperche S., Allain J.P., Levicnik-Stezinar S. Multiple HBV transfusion transmissions from undetected occult infections: revising the minimal infectious dose. *Gut.* 2019; 68(2): 313–21. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316490>
9. Raimondo G., Locarnini S., Pollicino T., Levrero M., Zoulim F., Lok A.S. Update of the statements on biology and clinical impact of occult hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 2019; 71(2): 397–408. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.03.034>
10. Candotti D., Laperche S. Hepatitis B virus blood screening: need for reappraisal of blood safety measures? *Front. Med. (Lansanne).* 2018; 5: 29. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00029>
11. Pisano M.B., Blanco S., Carrizo H., Ré V.E., Gallego S. Hepatitis B virus infection in blood donors in Argentina: prevalence of infection, genotype distribution and frequency of occult HBV

- infection. *Arch. Virol.* 2016; 161; (10): 2813–17. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2960-2>
12. Jutavijittum P., Andernach I.E., Yousukh A., Samountry B., Samountry K., Thammavong T., et al. Occult hepatitis B infections among blood donors in Lao PDR. *Vox Sang.* 2014; 106(1): 31–7. <https://doi.org/10.1111/vox.12073>
 13. Alavian S.M. Occult hepatitis B virus infection among hemodialysis patients. *Hepat. Mon.* 2012; 12(4): 242–3. <https://doi.org/10.5812/hepatmon.869>
 14. Smolle E., Zohrer E., Bettermann K., Haybaeck J. Viral hepatitis induces hepatocellular cancer: What can we learn from epidemiology comparing Iran and worldwide findings? *Hepat. Mon.* 2012; 12(10 HCC): e7879. <https://doi.org/10.5812/hepatmon.7879>
 15. Vaezjalali M., Rashidpour S., Rezaee H., Hajibeigi B., Zeidi M., Gachkar L., et al. Hepatitis B viral DNA among HBs antigen negative healthy blood donors. *Hepat. Mon.* 2013; 13(3): e6590. <https://doi.org/10.5812/hepatmon.6590>
 16. Серикова Е.Н., Семенов А.В., Останкова Ю.В., Тотолян А.А. Метод выявления вируса гепатита В в плазме крови при низкой вирусной нагрузке с использованием ПЦР в режиме реального времени. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2021; 66(1): 59–64. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2021-66-1-59-64>
 17. Останкова Ю.В., Семенов А.В., Тотолян Арег А. Выявление вируса гепатита В в плазме крови при низкой вирусной нагрузке. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2019; 64(10): 635–40. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-10-635-640>
 18. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Mol. Biol. Evol.* 2021; 38(7): 3022–7. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
 19. Покровский В.И., Тотолян А.А., ред. *Вирусные гепатиты в Российской Федерации. Аналитический обзор. 11 выпуск.* СПб.; 2018.
 20. Останкова Ю.В., Семенов А.В., Буркитбаев Ж.К., Савчук Т.Н., Тотолян А.А. Результаты генотипирования вируса гепатита В у HBsAg-негативных доноров крови в г. Астана, Казахстан. *Инфекция и иммунитет.* 2017; 7(4): 383–92. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2017-4-383-392>
 21. Бумбали С., Балде Т.Л., Семенов А.В., Останкова Ю.В., Серикова Е.Н., Найденова Е.В. и др. Распространенность маркеров вирусного гепатита В среди доноров крови в Гвинейской Республике. *Вопросы вирусологии.* 2022; 67(1): 59–68. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-92>
 22. Lin H., Zhao H., Tang X., Hu W., Jiang N., Zhu S., et al. Serological Patterns and Molecular Characterization of Occult Hepatitis B Virus Infection among Blood Donors. *Hepat. Mon.* 2016; 16(10): e40492. <https://doi.org/10.5812/hepatmon.40492>
 23. Tallo T., Tefanova V., Priimägi L., Schmidt J., Katargina O., Mikhailov M., et al. D2: major subgenotype of hepatitis B virus in Russia and the Baltic region. *J. Gen. Virol.* 2008; 89(Pt. 8): 1829–39. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83660-0>
 24. Шевцов А.Б., Филипенко М.Л., Киянбекова Л.С., Кравченко А.П., Омралина А.Е., Абеев А.Б. и др. Генотипы вируса гепатита В, циркулирующие на территории г. Астана. *Биотехнология. Теория и практика.* 2011; (4): 14–23.
 25. Sarkar N., Pal A., Das D., Saha D., Biswas A., Bandyopadhyay B., et al. Virological Characteristics of acute hepatitis B in eastern India: critical differences with chronic infection. *PLoS One.* 2015; 10(11): e0141741. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141741>
 26. Безуплова Л.В., Мануйлов В.А., Осипова Л.П., Мосина Я.Д., Порываева В.А., Агафонова О.А. и др. Результаты испытаний реагентов для иммуноферментного определения субтипа HBsAg и генотипа вируса гепатита В в образцах плазмы крови человека. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2020; 38(4): 188–95. <https://doi.org/10.17116/molgen202038041188>
 27. Moradi A., Zhand S., Ghaemi A., Javid N., Tabarraei A. Mutations in the S gene region of hepatitis B virus genotype D in Golestan Province-Iran. *Virus Genes.* 2012; 44(3): 382–7. <https://doi.org/10.1007/s11262-012-0715-z>
 28. Tang Y., Liu X., Lu X., He Q., Li G., Zou Y. Occult hepatitis B virus infection in maintenance hemodialysis patients: prevalence and mutations in "a" determinant. *Int. J. Med. Sci.* 2020; 17(15): 2299–305. <https://doi.org/10.7150/ijms.49540>
 29. Araújo S.D.R., Malheiros A.P., Sarmento V.P., Nunes H.M., Freitas P.E.B. Molecular investigation of occult hepatitis B virus infection in a reference center in Northern Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* 2022; 26(3): 102367. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2022.102367>
 30. Thi Cam Huong N., Trung N.Q., Luong B.A., Tram D.B., Vu H.A., Bui H.H., et al. Mutations in the HBV PreS/S gene related to hepatocellular carcinoma in Vietnamese chronic HBV-infected patients. *PLoS One.* 2022; 17(4): e0266134. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266134>
 31. Colagrossi L., Hermans L.E., Salpini R., Di Carlo D., Pas S.D., Alvarez M., et al. Immune-escape mutations and stop-codons in HBsAg develop in a large proportion of patients with chronic HBV infection exposed to anti-HBV drugs in Europe. *BMC Infect. Dis.* 2018; 18(1): 251. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3161-2>
 32. Hermans L.E., Svicher V., Pas S.D., Salpini R., Alvarez M., Ben Ari Z., et al. Combined analysis of the prevalence of drug-resistant hepatitis B virus in antiviral therapy-experienced patients in Europe (CAPRE). *J. Infect. Dis.* 2016; 213(1): 39–48. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv363>
 33. Al-Qahtani A.A., Al-Anazi M.R., Nazir N., Abdo A.A., Sanaï F.M., Al-Hamoudi W.K., et al. The correlation between hepatitis B virus precore/core mutations and the progression of severe liver disease. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2018; 8: 355. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00355>
 34. Sanaei N., Hashemi S.M.A., Dehno S.Z.S., Asl M.M., Moïni M., Malek-Hosseini S.A., et al. Precore/core mutations of hepatitis B virus genotype D arising in different states of infection. *Clin. Exp. Hepatol.* 2022; 8(1): 21–8. <https://doi.org/10.5114/ceh.2022.114253>
 35. Wang M., Xu R., Huang J., Liao Q., Tang X., Shan Z., et al. Molecular characteristics of the full-length genome of occult hepatitis B virus from blood donors in China. *Sci. Rep.* 2022; 12(1): 8194. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12288-0>

REFERENCES

1. Lin Y.Y., Liu C., Chien W.H., Wu L.L., Tao Y., Wu D., et al. New insights into the evolutionary rate of hepatitis B virus at different biological scales. *J. Virol.* 2015; 89(7): 3512–22. <https://doi.org/10.1128/JVI.03131-14>
2. Kao J.H. Molecular Epidemiology of Hepatitis B Virus. *Korean J. Intern. Med.* 2011; 26(3): 255–61. <https://doi.org/10.3904/kjim.2011.26.3.255>
3. Lin C.L., Kao J.H. Hepatitis B virus genotypes and variants. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2015; 5(5): a021436. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021436>
4. Ye Q., Shang S.Q., Li W. A new vaccine escape mutant of hepatitis B virus causes occult infection. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2015; 11(2): 407–10. <https://doi.org/10.4161/21645515.2014.994461>
5. Xue Y., Wang M.J., Yang Z.T., Yu D.M., Han Y., Huang D., et al. Clinical features and viral quasispecies characteristics associated with infection by the hepatitis B virus G145R immune escape mutant. *Emerg. Microbes. Infect.* 2017; 6(3): e15. <https://doi.org/10.1038/emi.2017.2>

6. Yll M., Cortese M.F., Guerrero-Murillo M., Orriols G., Gregori J., Casillas R., et al. Conservation and variability of hepatitis B core at different chronic hepatitis stages. *World J. Gastroenterol.* 2020; 26(20): 2584–98. <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i20.2584>
7. Mixson-Hayden T., Lee D., Ganova-Raeva L., Drobeniuc J., Stauffer W.M., Teshale E., et al. Hepatitis B virus and hepatitis C virus infections in United States-bound refugees from Asia and Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2014; 90(6): 1014–20. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0068>
8. Candotti D., Assennato S.M., Laperche S., Allain J.P., Levicnik-Stezinar S. Multiple HBV transfusion transmissions from undetected occult infections: revising the minimal infectious dose. *Gut.* 2019; 68(2): 313–21. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316490>
9. Raimondo G., Locarnini S., Pollicino T., Levrero M., Zoulim F., Lok A.S. Update of the statements on biology and clinical impact of occult hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 2019; 71(2): 397–408. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.03.034>
10. Candotti D., Laperche S. Hepatitis B virus blood screening: need for reappraisal of blood safety measures? *Front. Med. (Lausanne)*. 2018; 5: 29. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00029>
11. Pisano M.B., Blanco S., Carrizo H., Ré V.E., Gallego S. Hepatitis B virus infection in blood donors in Argentina: prevalence of infection, genotype distribution and frequency of occult HBV infection. *Arch. Virol.* 2016; 161(10): 2813–17. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2960-2>
12. Jutavijittum P., Andernach I.E., Yousukh A., Samounry B., Samounry K., Thammavong T., et al. Occult hepatitis B infections among blood donors in Lao PDR. *Vox Sang.* 2014; 106(1): 31–7. <https://doi.org/10.1111/vox.12073>
13. Alavian S.M. Occult hepatitis B virus infection among hemodialysis patients. *Hepat. Mon.* 2012; 12(4): 242–3. <https://doi.org/10.5812/hepatmon.869>
14. Smolle E., Zohrer E., Bettermann K., Haybaeck J. Viral hepatitis induces hepatocellular cancer: What can we learn from epidemiology comparing Iran and worldwide findings? *Hepat. Mon.* 2012; 12(10 HCC): e7879. <https://doi.org/10.5812/hepatmon.7879>
15. Vaezjalali M., Rashidpour S., Rezaee H., Hajibeigi B., Zeidi M., Gachkar L., et al. Hepatitis B viral DNA among HBs antigen negative healthy blood donors. *Hepat. Mon.* 2013; 13(3): e6590. <https://doi.org/10.5812/hepatmon.6590>
16. Serikova E.N., Semenov A. V., Ostankova Yu. V., Totolyan A.A. Method for detecting hepatitis B virus in blood plasma at low viral load using real-time PCR. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2021; (1): 59–64. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2021-66-1-59-64> (in Russian)
17. Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Totolyan Areg A. Hepatitis B virus identification in a blood plasma at a low viral load. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2019; (10): 635–40. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-10-635-640> (In Russian)
18. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Mol. Biol. Evol.* 2021; 38(7): 3022–7. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
19. Pokrovskiy V.I., Totolyan A.A., eds. *Viral Hepatitis in the Russian Federation. Analytical Review. Issue 11 [Virusnye gepatity v Rossiyskoy Federatsii. Analiticheskiy obzor. 11 vypusk]*. St. Petersburg; 2018. (in Russian)
20. Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Burkitbaev Zh.K., Savchuk T.N., Totolyan A.A. Results of genotyping hepatitis B virus B in HBsAg-negative blood donors in Astana, Kazakhstan. *Infektsiya i immunitet.* 2017; 7(4): 383–92. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2017-4-383-392> (in Russian)
21. Bumbali S., Balde T.L., Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Serikova E.N., Naydenova E.V. et al. Prevalence of viral hepatitis B markers among blood donors in the republic of Guinea. *Voprosy virusologii.* 2022; 67(1): 59–68. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-92> (in Russian)
22. Lin H., Zhao H., Tang X., Hu W., Jiang N., Zhu S., et al. Serological Patterns and Molecular Characterization of Occult Hepatitis B Virus Infection among Blood Donors. *Hepat. Mon.* 2016; 16(10): e40492. <https://doi.org/10.5812/hepatmon.40492>
23. Tallo T., Tefanova V., Priimägi L., Schmidt J., Katargina O., Michailov M., et al. D2: major subgenotype of hepatitis B virus in Russia and the Baltic region. *J. Gen. Virol.* 2008; 89(Pt. 8): 1829–39. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83660-0>
24. Shevtsov A.B., Filipenko M.L., Kiyankova L.S., Kravchenko A.P., Omralina A.E., Abeev A.B. et al. Hepatitis B virus genotypes circulating in Astana. *Biotechnology. Teoriya i praktika.* 2011; (4): 14–23. (in Russian)
25. Sarkar N., Pal A., Das D., Saha D., Biswas A., Bandopadhyay B., et al. Virological Characteristics of acute hepatitis B in eastern India: critical differences with chronic infection. *PLoS One.* 2015; 10(11): e0141741. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141741>
26. Bezuglova L.V., Manuylov V.A., Osipova L.P., Mosina Ya.D., Poryvaeva V.A., Agafonova O.A., et al. Trial results for elisa test kits for hbsag subtype and hepatitis B virus genotype identification in human blood plasma. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya.* 2020; 38(4): 188–95. <https://doi.org/10.17116/molgen202038041188> (in Russian)
27. Moradi A., Zhand S., Ghaemi A., Javid N., Tabarraei A. Mutations in the S gene region of hepatitis B virus genotype D in Golestan Province-Iran. *Virus Genes.* 2012; 44(3): 382–7. <https://doi.org/10.1007/s11262-012-0715-z>
28. Tang Y., Liu X., Lu X., He Q., Li G., Zou Y. Occult hepatitis B virus infection in maintenance hemodialysis patients: prevalence and mutations in "a" determinant. *Int. J. Med. Sci.* 2020; 17(15): 2299–305. <https://doi.org/10.7150/ijms.49540>
29. Araújo S.D.R., Malheiros A.P., Sarmento V.P., Nunes H.M., Freitas P.E.B. Molecular investigation of occult hepatitis B virus infection in a reference center in Northern Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* 2022; 26(3): 102367. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2022.102367>
30. Thi Cam Huong N., Trung N.Q., Luong B.A., Tram D.B., Vu H.A., Bui H.H., et al. Mutations in the HBV PreS/S gene related to hepatocellular carcinoma in Vietnamese chronic HBV-infected patients. *PLoS One.* 2022; 17(4): e0266134. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266134>
31. Colagrossi L., Hermans L.E., Salpini R., Di Carlo D., Pas S.D., Alvarez M., et al. Immune-escape mutations and stop-codons in HBsAg develop in a large proportion of patients with chronic HBV infection exposed to anti-HBV drugs in Europe. *BMC Infect. Dis.* 2018; 18(1): 251. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3161-2>
32. Hermans L.E., Svicher V., Pas S.D., Salpini R., Alvarez M., Ben Ari Z., et al. Combined analysis of the prevalence of drug-resistant hepatitis B virus in antiviral therapy-experienced patients in Europe (CAPRE). *J. Infect. Dis.* 2016; 213(1): 39–48. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv363>
33. Al-Qahtani A.A., Al-Anazi M.R., Nazir N., Abdo A.A., Sanaei F.M., Al-Hamoudi W.K., et al. The correlation between hepatitis B virus precore/core mutations and the progression of severe liver disease. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2018; 8: 355. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00355>
34. Sanaei N., Hashemi S.M.A., Dehno S.Z.S., Asl M.M., Moini M., Malek-Hosseini S.A., et al. Precore/core mutations of hepatitis B virus genotype D arising in different states of infection. *Clin. Exp. Hepatol.* 2022; 8(1): 21–8. <https://doi.org/10.5114/ceh.2022.114253>
35. Wang M., Xu R., Huang J., Liao Q., Tang X., Shan Z., et al. Molecular characteristics of the full-length genome of occult hepatitis B virus from blood donors in China. *Sci. Rep.* 2022; 12(1): 8194. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12288-0>

Информация об авторах

Останкова Юлия Владимировна[✉] — к.б.н., зав. лаб. иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции, с.н.с. лаб. молекулярной иммунологии СПбНИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, shenna1@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2270-8897>

Серикова Елена Николаевна — н.с. лаб. иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции СПбНИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0547-3945>

Семенов Александр Владимирович — д.б.н., директор Екатеринбургского НИИ вирусных инфекций ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», Екатеринбург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3223-8219>

Зуева Елена Борисовна — к.б.н., биолог отделения ВИЧ-инфекции и СПИД ассоциированных заболеваний СПбНИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0579-110X>

Валутите Диана Эдуардовна — врач клинической лабораторной диагностики отделения ВИЧ-инфекции и СПИД-ассоциированных заболеваний СПбНИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0931-102X>

Щемелев Александр Николаевич — м.н.с. лаб. иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции СПбНИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3139-3674>

Зурочка Владимир Александрович — д.м.н., с.н.с. лаб. иммунологии воспаления Института иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия; с.н.с. лаб. иммунобиотехнологии Научно-образовательного центра Российско-китайского центра системной патологии Южно-Уральского государственного университета, Челябинск, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8930-3742>

Тотоян Арег Артёмович — д.м.н., профессор, академик РАН, зав. лаб. молекулярной иммунологии, директор СПбНИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия; зав. каф. иммунологии Первого Санкт-Петербургского медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, <https://orcid.org/0000-0003-4571-8799>

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

Статья поступила в редакцию 06.08.2022;
принята к публикации 10.10.2022;
опубликована 30.12.2022

Information about the authors

Yulia V. Ostankova[✉] — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of HIV immunology and virology, senior researcher, Laboratory of molecular immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, shenna1@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2270-8897>

Elena N. Serikova — researcher, Laboratory of HIV immunology and virology, senior researcher, Laboratory of molecular immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0547-3945>

Aleksandr V. Semenov — D. Sci. (Biol.), Director, Ekaterinburg Research Institute of Viral Infections State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Yekaterinburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3223-8219>

Elena B. Zueva — Cand. Sci. (Biol.), biologist, Department of HIV infection and AIDS-associated diseases, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0579-110X>

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

Aleksandr N. Schemelelev — junior researcher, Laboratory of HIV immunology and virology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3139-3674>

Vladimir A. Zurochka — D. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of inflammatory immunology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russia; senior researcher, Laboratory of immunobiotechnology, Scientific and Educational Center of the Russian–Chinese Center for Systemic Pathology, South Ural State University, Chelyabinsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8930-3742>

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

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

The article was submitted 06.08.2022;
accepted for publication 10.10.2022;
published 30.12.2022



Влияние вакцинопрофилактики на заболеваемость ветряной оспой в России

Афони́на Н.М., Михеева И.В.✉

Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Аннотация

Введение. Значимость проблемы ветряной оспы (ВО) для здравоохранения и экономики России обусловили внедрение вакцинации против ВО в региональные программы иммунизации некоторых субъектов Российской Федерации и календарь прививок по эпидемическим показаниям.

Цель исследования — оценка эффективности вакцинации против ВО для научного обоснования рекомендаций по расширению национального календаря профилактических прививок.

Материалы и методы. Оценка эффективности вакцинации проведена путём сопоставления объёма вакцинации с показателями заболеваемости ВО в 2006–2021 гг. по данным форм № 2 и № 5 Государственного статистического наблюдения в России в целом и на отдельных территориях.

Результаты и обсуждение. Вакцинация против ВО детей в некоторых субъектах РФ в рамках региональных программ иммунизации и групп риска в рамках календаря прививок по эпидемическим показаниям до 2019 г. практически не влияла на эпидемиологическую ситуацию. Длительное разобщение организованных коллективов в период распространения COVID-19 в 2020 г. привело к снижению заболеваемости и накоплению в популяции лиц, не иммунных к *Varicella zoster*, что в последующем обусловило подъём заболеваемости ВО в стране в целом. Однако в Центральном, Приволжском и Сибирском федеральных округах удалось избежать роста заболеваемости ВО благодаря значительному увеличению объёма вакцинации детей в 2020–2021 гг. При этом в большинстве субъектов РФ ежегодно вакцинировали менее 2% детей в возрасте 1–6 лет. Вследствие недостаточного охвата прививками против ВО в регионах, где имеется многолетний опыт плановой иммунизации детей, происходит сдвиг заболеваемости на старшие возрастные группы и повышение риска развития врождённых форм инфекции.

Заключение. Для повышения эффективности вакцинопрофилактики ВО рекомендуется внедрить в национальный календарь прививок двукратные прививки с охватом не менее 90% детей в возрасте 1 года, а также продолжить практику иммунизации лиц более старшего возраста из групп риска заболевания.

Ключевые слова: *вакцинопрофилактика, ветряная оспа, заболеваемость, национальный календарь прививок*

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: Афони́на Н.М., Михеева И.В. Влияние вакцинопрофилактики на заболеваемость ветряной оспой в России. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(6):651–660.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-338>

Original article
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-338>

The effect of preventive vaccination on chickenpox incidence in Russia

Nataliya M. Afonina, Irina V. Mikheeva✉

Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. The significance of the chickenpox (CP) problem for public health and economy of Russia necessitated inclusion of CP vaccination in the regional immunization programs of some regions of the Russian Federation and in the vaccination schedule as an epidemic-response measure.

The **purpose** of the study was to assess the effectiveness of CP vaccination to provide the rationale for recommendations on expansion of the national preventive vaccination schedule.

Materials and methods. The vaccination effectiveness was assessed by comparison of the vaccination rates and CP incidence rates in 2006–2021 with the reference to the data collected from forms No. 2 and No. 5 of the National Statistical Monitoring in Russia and in its regions.

Results and discussion. Before 2019, in some regions of Russia, CP vaccination of children within regional immunization programs and vaccination of risk groups within the vaccination schedule following the epidemic-response measures had hardly any effect on the epidemiological situation. The remote-work and stay-at-home policies during the COVID-19 pandemic in 2020 resulted in a decrease in the incidence and an increased number of individuals who did not have immunity against *Varicella zoster*, thus subsequently leading to the increased CP incidence in the country. However, the Central, Volga, and Siberian Federal Districts were able to avoid an increase in the CP incidence due to the significantly increased vaccination coverage among children in 2020–2021. At the same time, in most of the regions, less than 2% of children aged 1–6 years were vaccinated annually. The insufficient CP vaccination coverage in the regions having extensive experience of planned immunization of children led to the shift of the incidence towards older age groups and increased risk of development of congenital infection.

Conclusion. To increase the effectiveness of CP preventive vaccination, it is recommended that the national vaccination schedule should include two-dose vaccination with the coverage of at least 90% of one-year-old children, while continuing immunization of older age individuals from the groups that are at risk of infection.

Keywords: preventive vaccination, chickenpox, incidence, national vaccination schedule

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: Afonina N.M., Mikheeva I.V. The effect of preventive vaccination on chickenpox incidence in Russia. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2022;99(6):651–660.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-338>

Введение

В настоящее время в России ветряная оспа (ВО) относится к числу наиболее широко распространённых инфекций [1–4].

Высокая интенсивность эпидемического процесса ВО определяет значительные экономические потери: на протяжении более 10 лет это заболевание занимает одно из ведущих мест в рейтинге экономической значимости инфекционных болезней, принося ежегодные потери в размере более 12 млрд руб. [5, 6].

В последние годы осложнённые формы ВО стали регистрироваться в 3 раза чаще, наблюдаются расширение клинического полиморфизма и нарастание доли крайне тяжёлых и летальных форм инфекции. Группами высокого риска в отношении возникновения тяжёлых клинических форм заболевания являются дети младенческого возраста [7], взрослые, беременные женщины и лица с ослабленным иммунитетом [8, 9].

Единственным эффективным средством профилактики ВО является иммунизация. Разработанная и клинически протестированная в Японии в 1970–1980-х гг. живая вакцина против ВО, а также созданные на её основе другие вакцинные препараты используются во многих странах. Прививки против ВО включены в национальные календари ряда развитых стран, на основе многолетнего опыта доказана эффективность вакцинопрофилактики этой инфекции [10, 11].

Значимость и актуальность проблемы ВО для здравоохранения и экономики России обусловили необходимость внедрения вакцинации против ВО в практику здравоохранения страны. Свердловская область и Мо-

сква стали первыми регионами, где с 2009 г., сразу после лицензирования зарубежных вакцинных препаратов для профилактики ВО в России, иммунизация против этой инфекции была включена в региональные календари профилактических прививок [12–15]. С 2014 г. вакцинация против ВО детям и взрослым из групп риска¹ входит в календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям.

С учётом современной эпидемиологической ситуации государством определены перспективы вакцинопрофилактики, документально оформленные в виде утверждённой в 2020 г. Стратегии развития иммунопрофилактики инфекционных болезней на период до 2035 г.² В качестве одного из основных направлений оптимизации национального календаря прививок Правительством обозначено расширение перечня инфекционных болезней, против которых будет проводиться вакцинация, в частности, внедрение плановых прививок детей против ВО.

В связи с этим было проведено исследование, целью которого являлась оценка эффективности вакцинации против ВО для научного обоснования рекомендаций по расширению национального календаря профилактических прививок в Российской Федерации.

¹ Приказ Министерства здравоохранения РФ № 1122н от 06.12.2021 «Об утверждении национального календаря профилактических прививок, календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям и порядке проведения профилактических прививок».

² Распоряжение Правительства РФ от 18.09.2020 № 2390-р «Об утверждении Стратегии развития иммунопрофилактики инфекционных болезней на период до 2035 года».

Материалы и методы

Для оценки эпидемиологической ситуации изучены данные формы № 2 Федерального государственного статистического наблюдения «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» о заболеваемости ВО в 2006–2021 гг. в России в целом и на отдельных территориях, а также формы № 23-17 «Сведения о вспышках инфекционных заболеваний» в 2017–2021 гг. Материалами для оценки объёма вакцинации против ВО послужили данные формы № 5 Федерального государственного статистического наблюдения «Сведения о профилактических прививках» в Российской Федерации и отдельных территориях в 2013–2021 гг.

В рамках описательного эпидемиологического исследования выполнен ретроспективный анализ распределения заболеваемости во временном, возрастном и территориальном аспектах (в разрезе федеральных округов (ФО) и субъектов РФ), а также с учётом охвата вакцинацией отдельных групп населения. Из-за отсутствия статистических данных о количестве лиц, привитых против ВО, ориентировочная оценка охвата однократной вакцинацией против ВО детского населения проводилась на основании расчёта отношения (в процентах) количества проведённых прививок к численности населения в возрастной группе 1–6 лет в анализируемом году. Для статистического анализа связи между уровнем заболеваемости ВО населения и количеством привитых против этой инфекции лиц был использован метод корреляции с расчётом коэффициента линейной корреляции Пирсона (r).

Результаты

До 2019 г. в России ежегодно заболевало ВО 800–900 тыс. человек, показатели заболеваемости находились на уровне около 600 на 100 тыс. населения и не наблюдалась тенденции к снижению заболеваемости (рис. 1).

В 2020 г., с началом пандемии COVID-19, в России впервые произошло снижение заболеваемости ВО на 40%: было зарегистрировано 490 тыс. случаев против 821 тыс. в 2019 г., показатель заболеваемости составил 333,9

на 100 тыс. населения. В 2021 г. показатель заболеваемости также оставался невысоким — 358,1 на 100 тыс. населения, но вновь наметилась тенденция к росту (рис. 1).

Наиболее высокие уровни заболеваемости ВО обычно регистрировались среди детей дошкольного возраста: в возрастной группе 3–6 лет ежегодные показатели достигали 6–8 тыс. на 100 тыс. детей данной возрастной группы, среди детей 1–2 лет — 2,5–3,0 тыс. на 100 тыс. детей данного возраста. В 2020 г. снижение заболеваемости наблюдалось во всех возрастных группах населения, в 2021 г. отмечен рост заболеваемости на 15% также во всех возрастных группах (рис. 2).

В организованных коллективах формировались крупные очаги инфекции. Ежегодно в детских дошкольных образовательных организациях регистрировалось 2,1–2,8 тыс. эпидемических вспышек ВО. На 2-м ранговом месте по числу крупных вспышек находились школы (662–826 множественных очагов инфекции ежегодно), что свидетельствовало о наличии значительной доли не иммунных к возбудителю детей в более старших возрастных группах. Так, только в 2017–2019 гг. в России было зарегистрировано 9785 эпидемических вспышек ВО с вовлечением в них 153 313 человек. При этом в 2019 г. отмечено наибольшее число крупных очагов (3663). Дать оценку вспышечной заболеваемости ВО в 2020 и 2021 гг. не представилось возможным в связи с тем, что в форме статистического наблюдения № 23-17 множественные очаги ВО и новой коронавирусной инфекции учитывались суммарно.

Согласно официальным статистическим данным, с 2013 по 2021 г. в России было проведено более 850 тыс. прививок против ВО. Ежегодно вакцинировали 32,0–199,8 тыс. человек (рис. 3).

Темпы вакцинации против ВО не имели стабильной тенденции к росту. Напротив, в некоторые годы происходило снижение объёма иммунизации. Так, в 2014 г. было сделано вдвое меньше прививок, чем в 2013 г. (85 и 41 тыс. прививок соответственно), а в 2015 г. — на 25% меньше, чем в 2014 г. После незначительного увеличе-

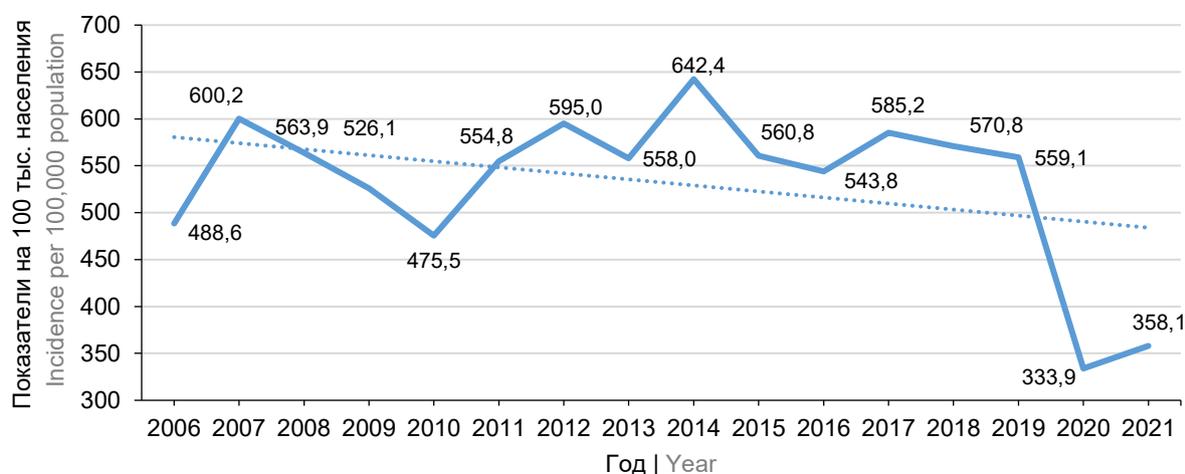


Рис. 1. Динамика заболеваемости ВО в России в 2006–2021 гг.

Fig. 1. Dynamics of CP incidence in Russia in 2006–2021.

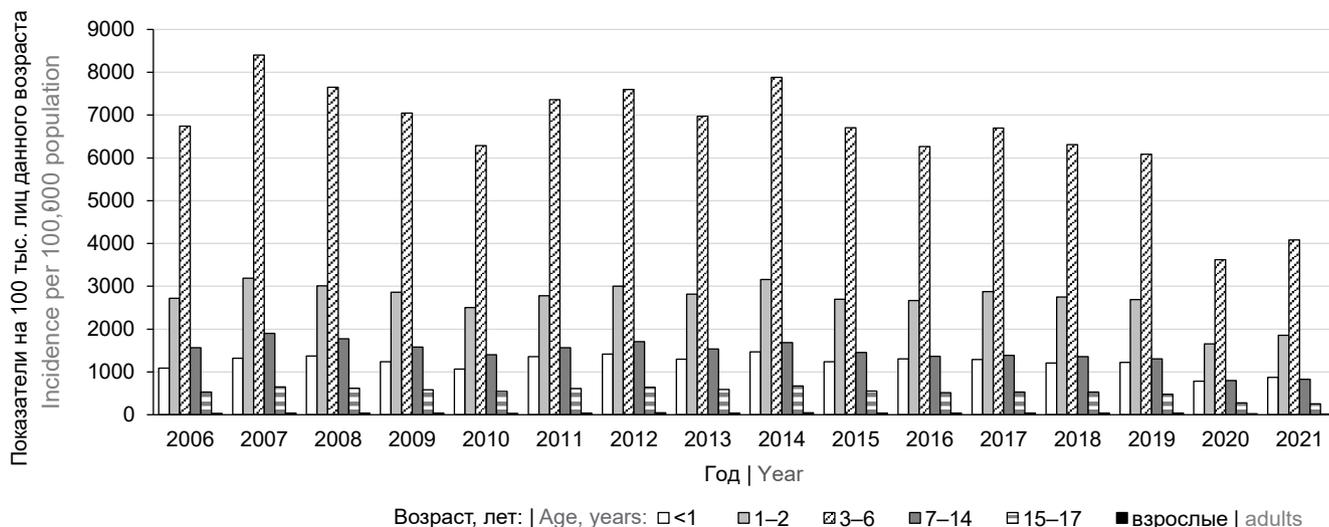


Рис. 2. Динамика заболеваемости ВО в России в разрезе возрастных групп в 2006–2021 гг.

Fig. 2. Dynamics of CP incidence in Russia in 2006–2021, by age groups.

ния объёма иммунизации в 2016 г. в последующие 2 года вновь наметилась тенденция его снижения. С 2019 г. отмечается ежегодное наращивание объёма иммунизации против ВО — в 2020 г. количество сделанных прививок возросло на 30% по сравнению с 2019 г., а в 2021 г. произошел рост числа выполненных прививок на 40% по сравнению с 2020 г. (рис. 3).

Таким образом, на фоне пандемии COVID-19 объём вакцинопрофилактики ВО не только не снизился, но, напротив, отмечена активизация профилактической работы в отношении этой инфекции.

Результаты корреляционного анализа зависимости показателей заболеваемости ВО от числа проведённых прививок против этой инфекции в России показали обратную средней степени связь в возрастных группах детей 3–6 и 7–14 лет (коэффициенты корреляции $r = -0,54 \pm 0,37$ и $r = -0,53 \pm 0,37$ соответственно; $p < 0,01$) и слабой степени отрицательную зависимость среди взрослых

(коэффициент корреляции $r = -0,37 \pm 0,41$; $p < 0,01$) и детей в возрасте до 1 года ($r = -0,34 \pm 0,42$; $p < 0,01$). При статистической обработке данных получены большие значения ошибок коэффициентов корреляции из-за слабой степени связи и недостаточной длительности наблюдения. Для количественной оценки силы связи необходимы дальнейший сбор данных и отдельный учёт выполненных прививок по возрастным группам.

Оценка распределения прививок по возрастным группам не продемонстрировала рост объёма вакцинации взрослых из групп риска в 2019–2021 гг.: в целом по стране ежегодно вакцинировали 45–49 тыс. взрослых. Подобная ситуация была характерна для всех ФО.

Напротив, объём вакцинации детей значительно увеличился — с 62 тыс. в 2019 г. до 154,5 тыс. в 2021 г. При этом в 2021 г. рост количества прививок отмечен практически во всех ФО, за исключением Уральского ФО (рис. 4).

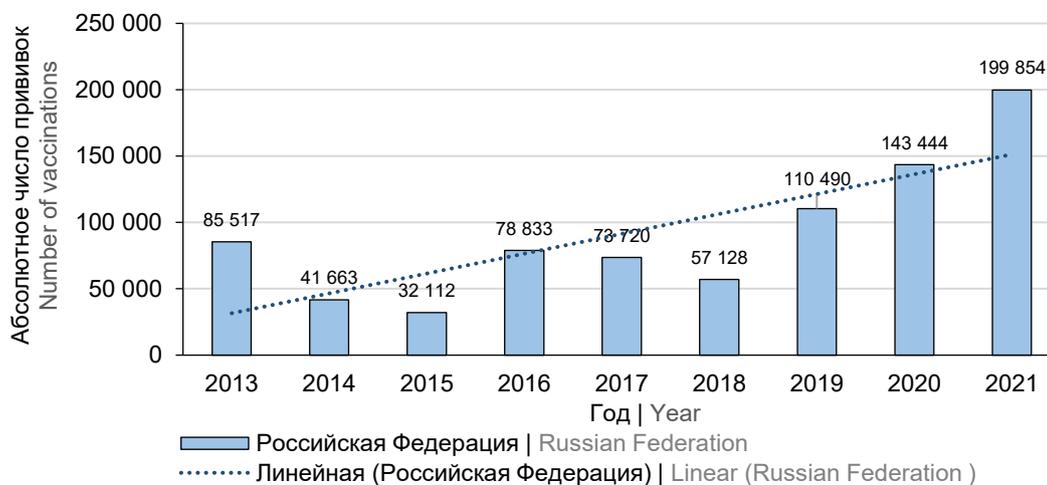


Рис. 3. Динамика числа выполненных прививок против ВО в России в 2013–2021 гг.

Fig. 3. Dynamics of people vaccinated against CP in Russia in 2013–2021.

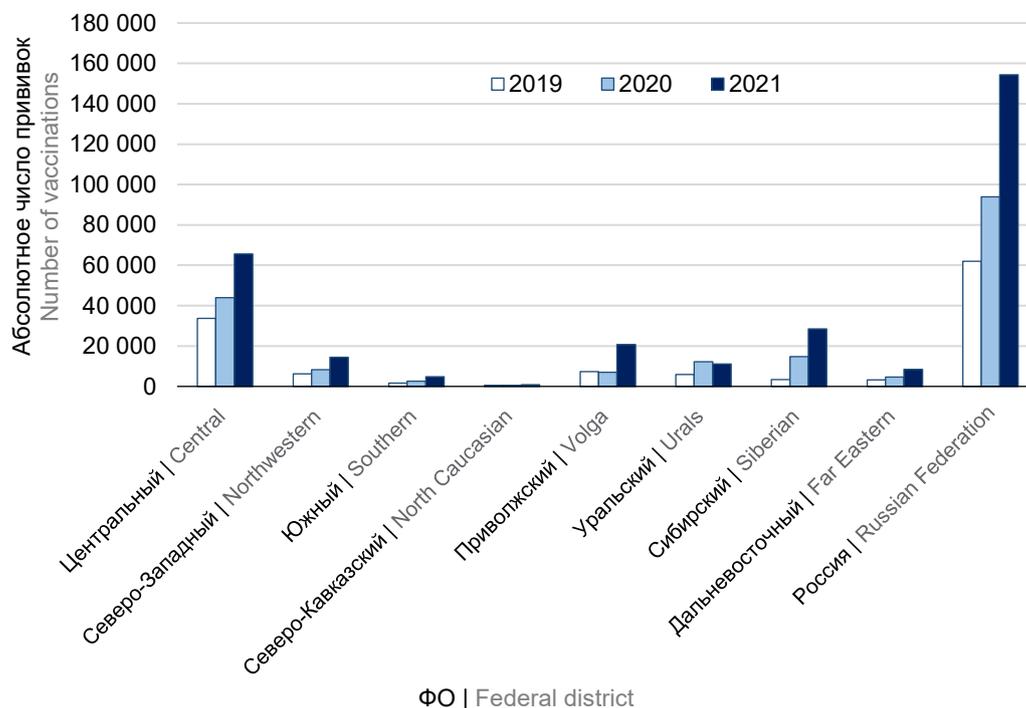


Рис. 4. Число выполненных прививок против ВО детскому населению России и в ФО РФ в 2019–2021 гг.
Fig. 4. The number of children vaccinated against CP in Russia and its FDs in 2019–2021.

Учитывая, что субъекты РФ автономно внедряют региональные программы иммунизации населения, дополнительно была проведена оценка объёма вакцинопрофилактики ВО в отдельных субъектах РФ в последние годы. Установлено, что в 2020–2021 гг. возросло число регионов РФ, которые активно расширяют свои региональные календари профилактических прививок путём внедрения в них плановых прививок против ВО детскому населению.

В то же время в 2020 г. в абсолютном большинстве ФО суммарно прививали менее 1% детей в возрасте 1–6 лет, за исключением Центрального и Сибирского ФО, где этот показатель составил 1,69 и 1,1% соответственно. В 2021 г. охват вакцинацией детей возрос во всех ФО, за исключением Уральского ФО (таблица).

В Центральном ФО в 2021 г. по сравнению с 2020 г. произошло увеличение объёма вакцинации на 50%,

Удельный вес детей в возрасте от 1 до 6 лет, привитых против ВО в 2020–2021 гг., в разрезе ФО РФ
Percentage of children aged 1–6 years, vaccinated against CP in 2020–2021, by FDs

ФО Federal District	2020		2021	
	абсолютное число прививок детям number of vaccinations	охват вакцинацией детского населения от 1 до 6 лет, % vaccination coverage of children from 1 to 6 years old, %	абсолютное число прививок детям number of vaccinations	охват вакцинацией детского населения от 1 до 6 лет, % vaccination coverage of children from 1 to 6 years old, %
Центральный Central	43 902	1,69	65 602	2,53
Сибирский Siberian	14 687	1,10	28 476	2,14
Северо-Западный Northwestern	8250	0,85	14 405	1,48
Дальневосточный Far Eastern	4725	0,72	8494	1,30
Уральский Urals	12 187	1,22	11 122	1,11
Приволжский Volga	6981	0,33	20 707	0,97
Южный Southern	2592	0,22	4736	0,41
Северо-Кавказский North Caucasian	581	0,06	810	0,09
Россия Russian Federation	93 905	0,87	154 352	1,44

приблизительный уровень охвата прививками детей дошкольного возраста в 2021 г. составил 2,53%; в Сибирском ФО отмечен рост числа прививок в 2 раза, охват составил 2,1%; в Северо-Западном ФО — увеличение на 75%, охват — 1,25%; в Дальневосточном ФО — рост на 80%, охват — 1,3%; в Приволжском ФО — рост в 3 раза, охват — 0,97%; в Южном ФО — рост на 83%, охват — 0,41%, (рис. 4, таблица).

Наибольшие охваты прививками детей дошкольного возраста в 2021 г. были достигнуты в следующих субъектах РФ: Сахалинская область — 11,6% (Дальневосточный ФО), Ямало-Ненецкий автономный округ — 10,1% (Уральский ФО), Новосибирская область — 9,6% (Сибирский ФО), Пензенская область — 9,3% (Приволжский ФО). В Москве показатель охвата вакцинацией детей дошкольного возраста в 2021 г. составил 5,3%, в Свердловской области — менее 1%.

Сравнительный анализ заболеваемости ВО в разрезе ФО в течение 3 последних лет показал, что бремя ВО различно в разных регионах РФ: традиционно в Северо-Западном и Уральском ФО показатели заболеваемости значительно превышают среднероссийские уровни, а в Южном и Северо-Кавказском ФО регистрируемая заболеваемость относительно невысокая (в 1,5–3,0 раза ниже среднероссийских показателей; **рис. 5**).

В 2020 г. снижение заболеваемости ВО на 40% произошло на всех территориях России, независимо от реализуемых на территориях программ детской иммунизации, что позволило сделать вывод о влиянии на заболеваемость введённых ограничительных мероприятий в отношении COVID-19.

Вместе с тем проведённый анализ заболеваемости в разрезе ФО и субъектов РФ показал, что в 2021 г. после

снятия ограничений в ряде ФО произошёл достоверно значимый рост уровней заболеваемости ВО (Северо-Западный, Южный, Уральский и Дальневосточный ФО), а в некоторых округах сохранилось эпидемиологическое благополучие по ВО (Центральный, Приволжский, Сибирский, Северо-Кавказский ФО; **рис. 5**). Причём подъём заболеваемости не наблюдался именно в тех округах, где в 2020–2021 гг. наиболее активно внедрялись в практику здравоохранения региональные программы иммунизации детского населения против ВО.

Так, в Центральном ФО нарастание объёма иммунизации произошло в подавляющем большинстве субъектов, и на верхних позициях в рейтинге субъектов по ориентировочному годовому охвату вакцинацией находились Москва, Курская, Ярославская, Брянская и Тверская области (охват более 2%). В Приволжском ФО в 2020–2021 гг. включили прививки детям в региональные календари в Пензенской, Нижегородской, Оренбургской областях, в Удмурдской Республике, Республике Татарстан и Пермском крае. Активно наращивали объём иммунизации детям дошкольного возраста в наиболее крупных субъектах Сибирского ФО — Новосибирской, Омской и Иркутской областях, где суммарно за 2 последних года было вакцинировано около 40 тыс. детей.

При этом опыт некоторых субъектов РФ свидетельствует о важности поддержания стабильно высокого уровня охвата плановой профилактической иммунизацией детей во избежание в последующие годы ухудшения эпидемиологической обстановки и сдвига заболеваемости на более старшие возрастные группы.

Так, в Свердловской области и в Москве в первые годы вакцинации детей против ВО (2009–2013 гг.) в рамках утверждённых на этих территориях региональных кален-

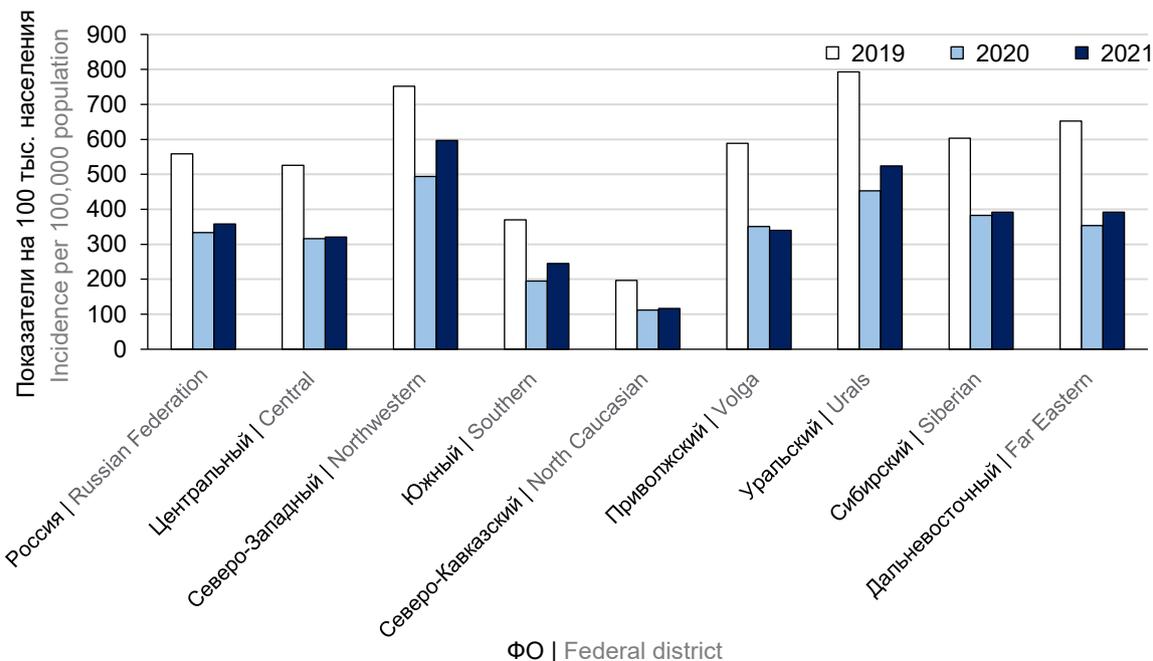


Рис. 5. Заболеваемость ВО в России и в ФО РФ в 2019–2021 гг.

Fig. 5. CP incidence in Russia and its FDs in 2019–2021.

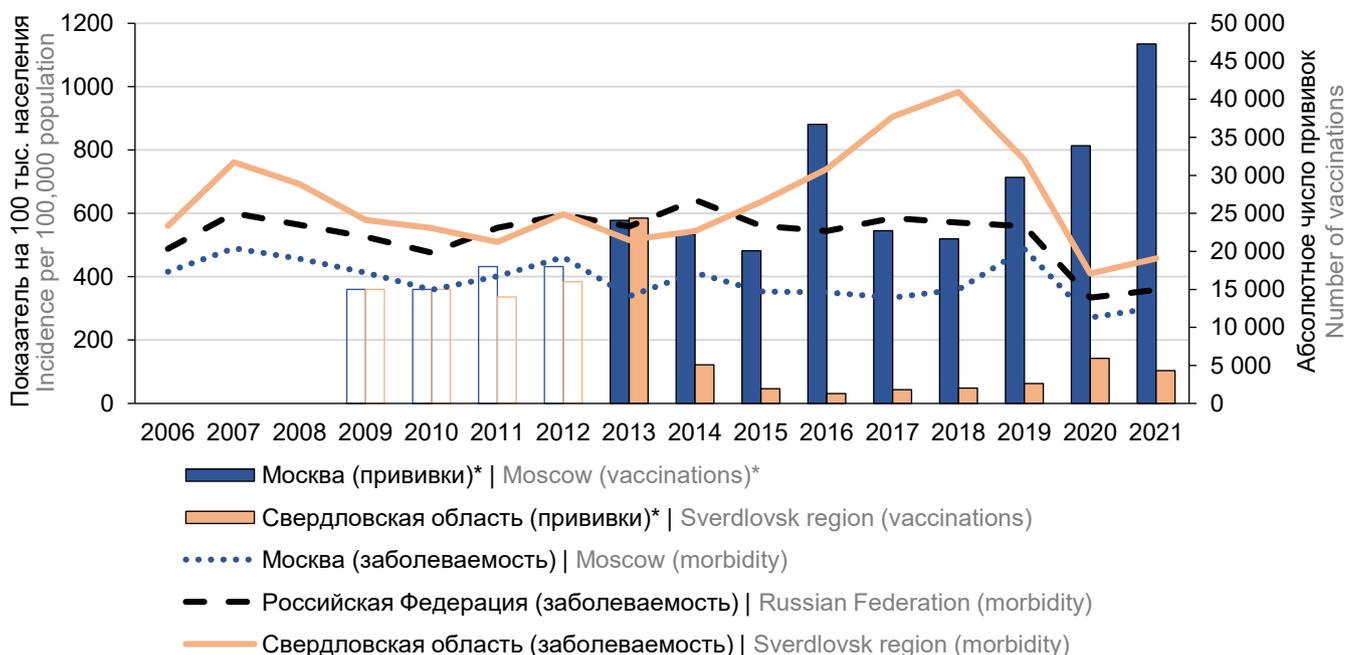


Рис. 6. Заболеваемость ВО и объём профилактической иммунизации в Москве и в Свердловской области в 2006–2021 гг.

Примечание: *столбики без окраски за 2009–2012 гг. — данные из неофициальных отчётов и экстраполированные данные, полученные на основе неполных опубликованных данных.

Fig. 6. CP incidence and preventive immunization coverage in Moscow and the Sverdlovsk Region in 2006–2021. Note. *non-highlighted columns show data for 2009–2012 from unofficial reports and extrapolated data from incomplete published information.

дарей прививок наблюдалась тенденция к снижению заболеваемости. Однако позднее в обоих регионах произошло ухудшение эпидемиологической ситуации: в Свердловской области — с 2015 г. на фоне резкого сокращения объёма вакцинации, в Москве — в 2019 г. на фоне множественной вакцинации с низкими уровнями охвата (рис. 6).

Проведённый авторами анализ заболеваемости ВО в разрезе возрастных групп в Москве [14] в многолетней динамике показал рост показателя заболеваемости взрослых с 2016 г., повышение заболеваемости детей младенческого возраста и рост доли заболевших ВО детей до 1 мес в 2020–2021 гг.

Обсуждение

Несмотря на проводимую с 2009 г. в отдельных субъектах РФ (Москва, Свердловская область) вакцинацию против ВО детей дошкольного возраста [15, 16], а также осуществляемую с 2014 г. вакцинацию групп риска в рамках календаря прививок по эпидемическим показаниям, заболеваемость этой инфекцией в России до 2019 г. не имела тенденции к снижению, а в организованных коллективах регистрировались эпидемические вспышки инфекции (в 2017–2019 гг. — более 3 тыс. крупных очагов ежегодно с отсутствием тенденции к уменьшению их числа).

Формирование множественных очагов ВО в детских организованных коллективах, медицинских организациях, учреждениях социального типа и других ор-

ганизациях обусловлено чрезвычайно высокой контагиозностью возбудителя. Отечественными авторами ранее отмечалось, что вспышки ВО зачастую не удаётся купировать с помощью противоэпидемических мероприятий без использования такого инструмента, как постконтактная иммунизация в очагах инфекции [2].

Экстренная вакцинопрофилактика в очаге ВО с 2014 г. регламентирована календарем прививок по эпидемическим показаниям, поэтому высокая вспышечная заболеваемость в 2017–2019 гг. может быть обусловлена недостаточным её проведением.

В связи с тем, что в России отсутствует отечественный вакцинный препарат для профилактики ВО, а закупки иностранных вакцин для регионов сопровождаются трудностями, темпы вакцинации против ВО в стране до 2019 г. не имели стабильной тенденции к росту.

При этом оценить уровни охвата прививками против ВО в субъектах РФ невозможно из-за отсутствия этих данных в статистической форме учета № 6 «Сведения о контингентах детей и взрослых, привитых против инфекционных заболеваний».

Учитывая высокое бремя ВО, в настоящее время субъекты РФ включают прививки против ВО детям в свои региональные календари профилактических прививок. Так, с 2019 г., несмотря на высокую нагрузку на учреждения здравоохранения в связи с распространением COVID-19, на значительном числе территорий РФ вырос объём вакцинопрофилактики ВО. При этом объём вакци-

нации увеличился не за счёт вакцинации взрослых лиц из групп повышенного риска в рамках календаря прививок по эпидемическим показателям, а за счёт плановой вакцинации детского населения в соответствии с региональными программами иммунизации регионов.

На основании результатов сравнительного анализа заболеваемости ВО и темпов иммунопрофилактики в разрезе ФО было показано, что в 2020 г. улучшение эпидемиологической ситуации по ВО в большей степени произошло в результате ограничительных мероприятий в связи с распространением COVID-19, чем из-за увеличения объёма вакцинации.

С учётом того, что в связи с массовыми ограничительными мероприятиями в детских коллективах в 2020 г. в популяции произошло накопление не переболевших ВО детей, на 2021 г. прогнозировали очередной циклический эпидемический подъём заболеваемости ВО, особенно среди детей, перенесших заболевание COVID-19. Вместе с тем ожидаемый рост заболеваемости не наблюдался в тех ФО, где наибольшее число субъектов включили прививки против ВО детям в свои региональные программы иммунизации и где охват иммунизацией детей дошкольного возраста был выше среднего по стране.

Однако тот факт, что к 2021 г. в большинстве субъектов прививки против ВО ежегодно получали менее 2% детей в возрасте 1–6 лет, демонстрирует низкие темпы вакцинации, которые не позволяют ещё долгое время достичь рекомендуемого ВОЗ уровня охвата прививками 85–90% [10]. В документах ВОЗ подчёркивается, что плановая иммунизация детей при уровне охвата ниже рекомендуемого может изменить эпидемиологические характеристики инфекции и привести к увеличению числа случаев заболевания среди детей более старшего возраста и взрослых [10]. Подобное наблюдается в Москве с 2016 г. [14]. А в условиях «повзросления» ВО увеличивается вероятность заболевания беременных и, следовательно, возрастает и риск внутриутробного заражения новорождённых с развитием врождённой или неонатальной ВО [16].

С подобными неблагоприятными тенденциями и аналогичными проблемами сталкивались во многих странах на начальных этапах внедрения вакцинопрофилактики ВО более 15 лет назад [17, 18].

В связи с этим в 2006 г. Консультативный комитет по практике иммунизации Центра по контролю заболеваний США принял рекомендации по проведению двукратной вакцинации детей, «подчищающей» вакцинации лиц, ранее получивших одну дозу вакцины, однократной вакцинации всех здоровых людей в возрасте старше 13 лет, ранее не болевших и не привитых, обязательной вакцинации при поступлении в школу, в колледж [19].

С учётом опыта других стран и рекомендаций ВОЗ [10] важно минимизировать риск негативных последствий, возможных на начальном этапе внедрения вакцинопрофилактики ВО, с помощью планирования региональных программ иммунизации на основе резуль-

татов эпидемиологического анализа, выполненного на достаточном методическом уровне. Необходимо обеспечить охват вакцинацией на уровне не менее 90%, решить вопрос о внедрении двукратной прививки против ВО, а также создать адекватный эпидемиологический надзор как за всеми формами инфекции *Varicella zoster* (ВО, врождённой формой инфекции, опоясывающим лишаем), так и за вакцинопрофилактикой этой инфекции³.

Выводы

Вакцинация против ВО в рамках календаря прививок по эпидемическим показаниям в России практически не влияла на заболеваемость этой инфекцией, в то время как длительное разобщение организованных коллективов в период распространения COVID-19 в 2020 г. привело к существенному улучшению эпидемиологической ситуации по ВО. При этом объём иммунизации детей против ВО остаётся крайне низким, охват прививками детей от 1 до 6 лет составляет менее 2%.

В 2021 г. не произошёл прогнозируемый рост заболеваемости ВО в Центральном, Приволжском и Сибирском ФО благодаря активному включению в региональные программы иммунизации субъектов этих округов прививок против этой инфекции детскому населению.

На основании регионального опыта рекомендуется внедрить в национальный календарь профилактических прививок двукратные прививки против ВО с охватом не менее 90% детей в возрасте 1 года.

При внедрении вакцинопрофилактики необходимо усилить эпидемиологический надзор за инфекцией, вызванной вирусом *Varicella zoster*: совершенствование статистического учёта вспышечной заболеваемости, а именно внедрение отдельного учёта вспышек ВО в форме № 23-17, внедрение учёта врождённых форм инфекции и дополнение формы № 6 сведениями о привитости детей и взрослых против ВО.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Каира А.Н., Лавров В.Ф., Свитич О.А., Соломай Т.В., Волосникова А.В. Особенности эпидемиологии ветряной оспы на отдельно взятой территории. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2020; 19(2): 63–9. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2020-19-2-63-69>
2. Ситник Т.Н., Штейнке Л.В., Габбасова Н.В. Ветряная оспа: «повзрослевшая» инфекция. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2018; 17(5): 54–9. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-5-54-59>
3. Харченко Г.А., Кимирилова О.Г. Ветряная оспа: клиника, лечение, профилактика. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2017; (2): 72–5.
4. Афонина Н.М., Михеева И.В. Современная эпидемиологическая характеристика ветряной оспы в России. *One Health & Risk Management*. 2020; (1): 12–21. <https://doi.org/10.38045/ohrm.2020.1.03>

³ МР 3.1.0224-20. 3.1. Профилактика инфекционных болезней. Эпидемиологический надзор за инфекцией, вызываемой вирусом *Varicella Zoster*. Методические рекомендации (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 14.12.2020)

5. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2019 году». М.; 2020.
6. Михеева М.А., Михеева И.В. Динамика рейтинга экономического ущерба от инфекционных болезней как критерий эффективности эпидемиологического контроля. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(2): 174–81. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-174-181>
7. Михайлова Е.В. Ветряная оспа у новорожденных: симптомы, осложнения, современные методы терапии и профилактики. В кн.: *Материалы XIII Конгресса детских инфекционистов России «Актуальные вопросы инфекционной патологии и вакцинопрофилактики»*. М.; 2014: 48–9.
8. Баликин В.Ф., Филоосфова М.С. Расширение клинического полиморфизма и нарастание тяжести инфекции *Varicella zoster* у детей. В кн.: *Материалы XIII Конгресса детских инфекционистов России «Актуальные вопросы инфекционной патологии и вакцинопрофилактики»*. М.; 2014: 8.
9. Зрячкин Н.И., Бучкова Т.Н., Чеботарева Г.И. Осложнения ветряной оспы (обзор литературы). *Журнал инфектологии*. 2017; 9(3): 117–28. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2017-9-3-117-128>
10. WHO. Varicella and herpes zoster vaccine: WHO position paper. *Weekly Epidemiological Record*. 2014; 89(25). Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer-8925-265-288>
11. Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases. In: *The Pink Book: Course Textbook*. 2021. Available at: <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/index.html>
12. Ковтун О., Романенко В., Казакевич Н., Саввина Н. Региональная программа вакцинопрофилактики: пути создания, достижения и перспективы. *Педиатрическая фармакология*. 2010; 7(4): 19–23.
13. Яковлева Т.В., Акимкин В.Г., Лыткина И.Н. Перспектива развития Национального календаря профилактических прививок. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2011; (1): 44–50.
14. Афонина Н.М., Михеева И.В. Эффективность региональных программ вакцинопрофилактики ветряной оспы. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2022; 11(3): 95–103. <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2022-11-3-95-103>
15. Филиппов О.В., Большакова Л.Н., Елагина Т.Н. Региональный календарь профилактических прививок в Москве: история, развитие, перспективы. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2020; 19(4): 63–75. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2020-19-4-63-75>
16. Ксенофонтова О., Рожкова Л., Саввинова Т., Харитонов А. Опыт вакцинопрофилактики ветряной оспы в г. Екатеринбург. *Педиатрическая фармакология*. 2010; 7(4): 34–7.
17. Lamont R.F., Sobel J.D., Carrington D., Mazaki-Tovi S., Kusanovic J.P., Vaisbuch E., et al. Varicella-zoster virus (chickenpox) infection in pregnancy. *BJOG*. 2011; 118(10): 1155–62. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2011.02983.x>
18. Asano Y. Varicella vaccine: the Japanese experience. *J. Infect. Dis.* 1996; 174(Suppl. 3): S310–3. https://doi.org/10.1093/infdis/174.supplement_3.s310
19. Chaves S.S., Gargiullo P., Zhang J.X., Civen R., Guris D., Mascola L., et al. Loss of vaccine-induced immunity to varicella over time. *N. Engl. J. Med.* 2007; 356(11): 1121–9. <https://doi.org/10.1056/nejmoa064040>
20. Marin M., Güris D., Chaves S.S., Schmid S., Seward J.F. Prevention of varicella: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm. Rep.* 2007; 56(RR-4): 1–40.
21. Kaira A.N., Lavrov V.F., Svitich O.A., Solomay T.V., Volosnikova A.V. Features of the epidemiology of chickenpox in a single territory. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2020; 19(2): 63–9. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2020-19-2-63-69> (in Russian)
22. Sitnik T.N., Shteynke L.V., Gabbasova N.V. Chicken-pox: «growing» up infection. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2018; 17(5): 54–9. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-5-54-59> (in Russian)
23. Kharchenko G.A., Kimirilova O.G. Chickenpox: clinic, treatment, prevention. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 2017; (2): 72–5. (in Russian)
24. Afonina N.M., Mikheeva I.V. Modern epidemiological characteristic of chickenpox in Russia. *One Health & Risk Management*. 2020; (1): 12–21. <https://doi.org/10.38045/ohrm.2020.1.03> (in Russian)
25. State Report «On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2019». Moscow; 2020. (in Russian)
26. Mikheeva M.A., Mikheeva I.V. Ranking dynamics of economic burden of infectious diseases as a criterion of effectiveness of epidemiologic control. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(2): 174–81. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-174-181> (in Russian)
27. Mikhaylova E.V. Chickenpox in newborns: symptoms, complications, modern methods of therapy and prevention. In: *Materials of the XIII Congress of Children's Infectious Diseases of Russia «Actual Issues of Infectious Pathology and Vaccine Prevention» [Materialy XIII Kongressa detskikh infektsionistov Rossii «Aktual'nye voprosy infektsionnoy patologii i vaksino profilaktiki»]*. Moscow; 2014: 48–9. (in Russian)
28. Balikin V.F., Filosofova M.S. The expansion of clinical polymorphism and the increase in the severity of Varicella zoster infection in children. In: *Materials of the XIII Congress of Children's Infectious Diseases of Russia «Actual Issues of Infectious Pathology and Vaccine Prevention» [Materialy XIII Kongressa detskikh infektsionistov Rossii «Aktual'nye voprosy infektsionnoy patologii i vaksino profilaktiki»]*. Moscow; 2014: 8. (in Russian)
29. Zryachkin N.I., Buchkova T.N., Chebotareva G.I. Complications of chickenpox (literature review). *Zhurnal infektologii*. 2017; 9(3): 117–28. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2017-9-3-117-128> (in Russian)
30. WHO. Varicella and herpes zoster vaccine: WHO position paper. *Weekly Epidemiological Record*. 2014; 89(25). Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer-8925-265-288>
31. Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases. In: *The Pink Book: Course Textbook*. 2021. Available at: <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/index.html>
32. Kovtun O., Romanenko V., Kazakevich N., Savvina N. Regional vaccination programme: ways to establish, results and prospects. *Pediatricheskaya farmakologiya*. 2010; 7(4): 19–23. (in Russian)
33. Yakovleva T.V., Akimkin V.G., Lytkina I.N. The prospect of the national immunizations schedule. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2011; (1): 44–50. (in Russian)
34. Afonina N.M., Mikheeva I.V. Effectiveness of regional varicella vaccination programmes. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie*. 2022; 11(3): 95–103. <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2022-11-3-95-103> (in Russian)
35. Filippov O.V., Bol'shakova L.N., Elagina T.N. Regional Schedule of Vaccination in Moscow: History, Development, Prospects. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2020; 19(4): 63–75. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2020-19-4-63-75> (in Russian)
36. Ksenofontova O., Rozhkova L., Savvinova T., Kharitonov A. Experience of vaccine prevention for varicella in Yekaterin-

REFERENCES

- burg. *Pediatriceskaya farmakologiya*. 2010; 7(4): 34–7. (in Russian)
17. Lamont R.F., Sobel J.D., Carrington D., Mazaki-Tovi S., Kusanovic J.P., Vaisbuch E., et al. Varicella-zoster virus (chickenpox) infection in pregnancy. *BJOG*. 2011; 118(10): 1155–62. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2011.02983.x>
 18. Asano Y. Varicella vaccine: the Japanese experience. *J. Infect. Dis.* 1996; 174(Suppl. 3): S310–3. https://doi.org/10.1093/infdis/174.supplement_3.s310
 19. Chaves S.S., Gargiullo P., Zhang J.X., Civen R., Guris D., Mascola L., et al. Loss of vaccine-induced immunity to varicella over time. *N. Engl. J. Med.* 2007; 356(11): 1121–9. <https://doi.org/10.1056/nejmoa064040>
 20. Marin M., Güris D., Chaves S.S., Schmid S., Seward J.F. Prevention of varicella: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm. Rep.* 2007; 56(RR-4): 1–40.

Информация об авторах

Афонина Наталья Михайловна — к.м.н., н.с. лаб. иммунопрофилактики ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3205-4025>

Михеева Ирина Викторовна — д.м.н., профессор, зав. лаб. иммунопрофилактики ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, irina_mikheeva@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8736-4007>

Участие авторов. Концепция и дизайн исследования, редактирование — Михеева И.В.; сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание текста — Афонина Н.М. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 29.09.2022;
принята к публикации 08.12.2022;
опубликована 30.12.2022

Information about the authors

Nataliya M. Afonina — Cand. Sci. (Med.), researcher, Laboratory of immunization, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3205-4025>

Irina V. Mikheeva — D. Sci. (Med.), Professor, Head, Laboratory of immunization, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, irina_mikheeva@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8736-4007>

Author contribution. Research concept and design, editing — Mikheeva I.V.; collection and processing of material, statistical processing, writing text — Afonina N.M. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 29.09.2022;
accepted for publication 08.12.2022;
published 30.12.2022



Двуспиральные РНК — перспективные адъюванты для повышения иммуногенности вакцин

Каплина О.Н.[✉], Гамалей С.Г., Иванова О.С., Даниленко Е.Д.

Институт медицинской биотехнологии Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор», Бердск, Россия

Аннотация

Введение. Наиболее эффективным способом предотвращения инфекционных заболеваний является вакцинопрофилактика. Оптимизировать уровень иммунного ответа вакцин призваны адъюванты. Одним из перспективных, но недостаточно изученных адъювантов являются двуспиральные рибонуклеиновые кислоты (дсРНК) из природных источников.

Цель исследования — изучение адъювантной активности дсРНК, полученной из киллерного штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, с использованием двух моделей индукции специфического иммунного ответа.

Материалы и методы. В экспериментах использовали субстанцию препарата ридостин с содержанием дсРНК 21,72% (производство ИМБТ ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). Специфическую иммунную реакцию моделировали с помощью овальбумина (ОВА) или субстанции вакцины «ЭпиВакКорона» (ЭВК). Эксперименты проведены на 200 самках мышей линии BALB/c. Мышам опытных групп вводили двукратно с интервалом 28 дней антиген (ОВА или ЭВК) и адъювант, мышам группы сравнения — только антиген. На 10-е сутки после 2-й иммунизации забирали образцы крови для определения уровня специфических антител методом иммуноферментного анализа. Результаты оценивали, рассчитывая среднегеометрические титры специфических антител к ОВА или ЭВК.

Результаты. Двукратное введение ОВА или ЭВК мышам приводило к появлению в крови животных специфических антител в титрах, зависящих от дозы вводимого антигена. Совместное введение антигена и дсРНК вызывало увеличение интенсивности иммунного ответа. Наиболее высокий стимулирующий эффект дсРНК наблюдался в дозе 100 мкг/мышь при введении мышам, иммунизированным ОВА (1 мкг/мышь), и в дозе 50 мкг/мышь — при иммунизации субстанцией ЭВК (0,25 человеческой дозы).

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о наличии у субстанции дсРНК адъювантных свойств, что даёт основание рассматривать дсРНК в качестве перспективного адъюванта для пептидных вакцин.

Ключевые слова: *двуспиральные РНК, дсРНК, адъювант, овальбумин, субстанция вакцины «ЭпиВакКорона», мыши*

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и международных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Приложением А Европейской конвенции об охране позвоночных животных, используемых для экспериментов и в других научных целях (ETS № 123, Страсбург, 1986), и Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. Протокол исследования одобрен Биоэтической комиссией ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (протокол № 5 от 01.10.2020).

Благодарность. Коллектив авторов выражает благодарность Е.А. Рыжикову за предоставление субстанции вакцины против новой коронавирусной инфекции COVID-19 «ЭпиВакКорона» (полупродукт, без гидроокиси алюминия) производства ООО «Эпивак».

Источник финансирования. Исследование проведено в рамках выполнения государственного задания ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», тема ГЗ-1/22 «Поиск и фармако-токсикологическое исследование новых вакцинных адъювантов».

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

Для цитирования: Каплина О.Н., Гамалей С.Г., Иванова О.С., Даниленко Е.Д. Двуспиральные РНК — перспективные адъюванты для повышения иммуногенности вакцин. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(6):661–668.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-342>

Original article
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-342>

Double-stranded RNAs are promising adjuvants for enhancing immunogenicity of vaccines

Olga N. Kaplina[✉], Svetlana G. Gamaley, Olga S. Ivanova, Elena D. Danilenko

Institute of Medical Biotechnology of the State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Berdsk, Russia

Abstract

Background. The most effective way to prevent infectious diseases is vaccination. Adjuvants contribute to the optimization of the immune response of vaccines. Double-stranded ribonucleic acids (dsRNAs) from natural sources are promising, but insufficiently studied adjuvants.

The **aim** of the work was to study the adjuvant activity of dsRNA obtained from the killer strain of *Saccharomyces cerevisiae* using two models of induction of a specific immune response.

Materials and methods. In the experiments, the substance of the drug Ridostin containing dsRNA, 21.72% (produced by Institute of Medical Biotechnology of the State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector"), was used. A specific immune response was modeled using ovalbumin (OVA) or the substance of the EpiVacCorona vaccine (EVC). The experiments were carried out in 200 female BALB/c mice. Mice of the experimental groups were injected twice with antigen and adjuvant together with a 28-day interval, mice of the comparison group — with antigen only. On the 10th day after the second immunization, blood samples were collected to determine the level of specific antibodies using enzyme immunoassay. The results were evaluated by calculation of the average geometric titers of specific antibodies against OVA or EVC.

Results. OVA or EVC administered twice induced the specific antibodies in mice in dose-dependent titers. The combined administration of antigen and dsRNA increased the strength of the immune response. The highest stimulating effect of dsRNA was observed in the dose of 100 µg/mouse administered into mice immunized with OVA (1 µg/mouse) or in the dose of 50 µg/mouse in mice immunized with EVC substance (0.25 of a human dose per mouse).

Conclusion. The data obtained indicate that the substance of dsRNA exerts adjuvant properties, which gives reason to consider dsRNA as a promising adjuvant for peptide vaccines.

Keywords: double-stranded RNA, dsRNA, adjuvant, ovalbumin, EpiVacCorona vaccine, mice

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and international standards for the use of laboratory animals in accordance with Appendix A of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (ETS № 123, Strasbourg, 1986), and Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. The research protocol was approved by the Bioethical Commission of the State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" (protocol No. 5, October 01, 2020).

Acknowledgement. The authors express gratitude to E.A. Ryzhikov for providing the substance of the EpiVacCorona vaccine against a new COVID-19 coronavirus infection (semi-product, without aluminum hydroxide, EpiVac LLC).

Funding sources. This work was carried out as part of the State Assignment 1/22 of The State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" "Search and pharmaco-toxicological study of new vaccine adjuvants".

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

For citation: Kaplina O.N., Gamaley S.G., Ivanova O.S., Danilenko E.D. Double-stranded RNAs are promising adjuvants for enhancing immunogenicity of vaccines. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(6):661–668.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-342>

Введение

Поиск природных веществ, усиливающих иммунный ответ организма на введение вакцин, разработка и получение синтетических соединений с адьювантными свойствами имеют огромное значение для обеспечения эффективной вакцинации населения против вирусных агентов разной природы, в том числе особо опасных. Среди перспективных иммунобиологических препаратов, усиливающих иммунный ответ организма на введение вакцин, можно выделить цитокины (интерфероны (ИФН), интер-

лейкины, колониестимулирующие факторы), а также индукторы ИФН. На экспериментальных моделях с использованием разных видов животных показано, что такие цитокины, как ИФН- α , ИФН- γ , фактор некроза опухоли- α , гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, обладают адьювантной активностью при вакцинации против широкого спектра инфекций: ВИЧ, бешенства, гриппа, гепатита, герпеса, клещевого энцефалита [1–7].

Индукторы ИФН — двуспиральные рибонуклеиновые кислоты (дсРНК) в силу своей структу-

ры, близкой к структуре промежуточных продуктов вирусной репликации, способны взаимодействовать с клеточными рецепторами и инициировать внутриклеточные сигнальные каскады, ведущие к продукции ИФН- α /ИФН- β [8–10]. ИФН активируют множественные ИФН-зависимые механизмы, необходимые для ингибирования репликации вирусов [9, 11–13]. Помимо индукции противовирусных реакций, дсРНК обладают широким спектром иммуномодулирующей активности. Так, они вызывают повышение поглотительной, метаболической и бактерицидной активности клеток-фагоцитов (макрофаги, нейтрофилы), активности натуральных киллеров, созревание и активацию дендритных клеток, что, в свою очередь, приводит к активации CD8⁺- и CD4⁺-Т-клеток [14]. Всё это позволяет говорить о том, что дсРНК играют роль своеобразных функциональных линкеров между системами врождённого и приобретённого иммунитета.

На основе синтетических и природных дсРНК создан ряд препаратов для лечения вирусных заболеваний: Ampligen, Hiltonol (США), Полиаденур (Франция), RGC100 (Германия), Ридостин, Полудан (Россия), Ларифан (Латвия). Способность дсРНК, как правило, синтетических, таких как Poly(I:C) и её производные, усиливать иммуногенность вакцин продемонстрирована в экспериментальных условиях при вакцинации против гриппа, в том числе птичьего [15], лихорадок Эбола [16], денге [17], ортопоксвирусных инфекций [18]. Эти данные свидетельствуют о перспективности использования препаратов дсРНК в качестве универсальных адъювантов для усиления иммунного ответа организма на введение вакцин.

Цель исследования — изучение адъювантной активности природных дсРНК, полученных из киллерных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, с использованием разных моделей индукции специфического иммунного ответа.

Материалы и методы

Препараты

В экспериментах использовали субстанцию препарата ридостин, полученную в отделе разработки технологий и пилотного производства биопрепаратов ИМБТ ГНЦ ВБ «Вектор». Субстанция ридостина (натриевая соль дсРНК, ФСП Р№ 002021/01 — 07 04 20090769-08) представляла собой смесь дрожжевых одноцепочечных и дсРНК с содержанием дсРНК 21,7%.

Для моделирования специфической иммунной реакции были выбраны следующие препараты:

- овалбумин (ОВА; Albumin from chicken egg white lyophilized powder, $\geq 98\%$ (agarose gel electrophoresis), кат. № А5503-5G, «Sigma»);
- субстанция вакцины «ЭпиВакКорона» (ЭВК; ООО «Эпивак», р.п. Кольцово, Россия), со-

держащая пептидные иммуногены, ковалентно связанные с белком-носителем, без добавления адъюванта гидроокиси алюминия [19, 20]. Концентрация белка в субстанции ЭВК составляла 2,5 мг/мл.

Животные

Исследование проведено на 200 самках мышей линии BALB/c в возрасте 6 нед с массой тела 18–22 г, полученных из питомника ГНЦ ВБ «Вектор». Животные были разделены случайным образом на группы по 6 особей. Содержание и манипуляции с животными осуществляли с соблюдением принципов гуманного отношения к лабораторным животным согласно Приложению А к Европейской конвенции об охране позвоночных животных, используемых для экспериментов и в других научных целях (ETS № 123, Страсбург, 1986). Эксперименты были одобрены Биоэтической комиссией ГНЦ ВБ «Вектор» (ГНЦ ВБ «Вектор»/10-09.2020, утверждён протоколом Биоэтической комиссии № 5 от 01.10.2020).

Способ моделирования иммунного ответа

Для индукции иммунного ответа в I серии экспериментов мышам опытных групп вводили внутримышечно с интервалом 28 сут ОВА в дозах 1, 5, 10 и 20 мкг/мышь и субстанцию дсРНК в дозах 50, 100 или 200 мкг/мышь одновременно с антигеном в суммарном объёме 200 мкл/мышь. На каждую дозу ОВА использовали 3 дозы субстанции дсРНК. Мыши группы сравнения получали инъекции ОВА в тех же дозах в объёме 200 мкл/мышь по аналогичной схеме. Суммарный объём препаратов 200 мкл вводили по 100 мкл в левую и правую задние лапы.

Во II серии экспериментов субстанцию ЭВК вводили животным в дозах, соответствующих 0,25, 0,5, 1,0, и 2,0 человеческой дозы/мышь (1 человеческая доза — 225 \pm 45 мкг белка/0,5 мл). Схема введения вакцины, схема и дозы введения субстанции дсРНК соответствовали описанному для экспериментов с ОВА.

Забор крови, получение сывороток крови

Процедура выполнялась на анестезированных с помощью углекислого газа животных [21]. Забор крови у мышей проводили на 10-й день после 2-й иммунизации пастеровской пипеткой из ретроорбитального синуса в объёме 0,5 мл в чистые пробирки типа Эппендорф. Для формирования сгустка и отделения сыворотки кровь оставляли при комнатной температуре на 1 ч, затем выдерживали в холодильнике при 4 \pm 2 °С в течение 2 ч. Центрифугирование проводили на центрифуге 5810R («Eppendorf») при температуре 6 \pm 2 °С со скоростью 1800 об/мин в течение 20 мин. Сыворотки крови хранили при темпе-

ратуре $6 \pm 2^\circ\text{C}$ не более 7 дней. Для более длительного хранения сыворотки замораживали при -20°C .

Этаназия животных

После забора крови мышей подвергали этаназии путём цервикальной дислокации [22].

Метод определения титра специфических антител

Для оценки уровня специфических антител в сыворотках иммунизированных мышей методом иммуноферментного анализа в лунки 96-луночных планшетов («Grainer Bio-One») вносили по 100 мкл/лунку раствора антигена (ОВА или субстанцию ЭВК) с концентрацией 5 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), pH 7,4. Антигены сорбировали, инкубируя содержимое лунок планшетов в течение 2 ч при 37°C и 16 ч при 4°C . Раствор с несвязавшимся антигеном удаляли, в лунки вносили по 200 мкл блокирующего буфера (1% раствор бычьего сывороточного альбумина в ФСБ, pH 7,4). Планшеты инкубировали 2 ч при 37°C , затем лунки планшета трехкратно промывали ФСБ с 0,05% Твин-20 по 350 мкл/лунку.

В лунки ряда А вносили по 200 мкл ФСБ, а в лунки рядов В–Н — по 100 мкл ФСБ с 0,05% Твин-20 и 0,5% раствором бычьего сывороточного альбумина. В лунки ряда А с 1 по 12 стрип вносили 12 образцов суммарных сывороток иммунизированных животных (сыворотки от 6 животных каждой группы объединяли в один пул для анализа). Далее проводили титрование в вертикальных рядах планшета. Из ряда А в ряд В и далее последовательно переносили по 25 мкл раствора, содержащего анализируемые сыворотки (5-кратное титрование), с 10-кратным перемешиванием (пипетированием) раствора в лунках каждого ряда перед переносом в следующий ряд. Из ряда Н по 25 мкл раствора отбрасывали. Для контроля конъюгата в 2 лунки (Н11 и Н12) без образцов сывороток вносили буферный раствор для разведения (однократный ФСБ, pH 7,4, с 0,05% Твин-20 и 0,5% раствором БСА). Планшеты инкубировали на горизонтальном термощейкере PST-60HL-4 («BioSan») 1,5 ч при перемешивании со скоростью 310 об/мин и температуре 37°C . После инкубации лунки планшета пятикратно промывали, как описано выше.

Раствор конъюгата антител козы против IgG мыши с пероксидазой хрена («Sigma») в разведении 1 : 4000 в буферном растворе для разведения вносили в лунки по 100 мкл, инкубировали 1 ч на термощейкере (310 об/мин, 37°C). После инкубации четырехкратно промывали, как описано выше. Для проявления цветной реакции в каждую лунку вносили по 100 мкл раствора хромогена — 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (однокомпонентный готовый раствор, «Sigma-Aldrich»), инкубировали

30 мин при комнатной температуре в защищённом от прямых солнечных лучей месте. Остановку реакции проводили, добавляя в каждую лунку по 50 мкл «стоп-реагента» (1 М раствор серной кислоты). Величину оптической плотности растворов регистрировали при длине волны 450 нм с помощью микропланшетного ридера «Varioskan Lux» («Thermoscientific»).

За титр антител анализируемого образца принимали наибольшее разведение исследуемой сыворотки, значение оптической плотности (ОП) которой превышает значение критической (пограничной) оптической плотности ($\text{ОП}_{\text{кр}}$), которое рассчитывали по формуле:

$$\text{ОП}_{\text{кр}} = \text{ОП}_{\text{ср}} K_{\text{к}} \times 2,$$

где $\text{ОП}_{\text{ср}} K_{\text{к}}$ — среднее значение ОП контроля конъюгата в лунках Н11 и Н12.

Результаты теста считали положительными, если ОП анализируемой сыворотки превышала $\text{ОП}_{\text{кр}}$, отрицательными — если ОП сыворотки меньше или равно $\text{ОП}_{\text{кр}}$.

Расчёт среднегеометрического титра (СГТ) для каждой группы проводили с помощью программы «Microsoft Excel» по формуле:

$$\text{СГТ} = \sqrt[3]{X1 \times X2 \times X3/3},$$

где $X1$, $X2$, $X3$ — титры суммарной сыворотки для каждой группы мышей в 3 повторах.

Результаты

Результаты, представленные в табл. 1, свидетельствуют о том, что двукратное введение ОВА в диапазоне доз 1–20 мкг/мышь приводило к появлению в крови животных специфических антител в титрах от 100 до 387 298 в зависимости от дозы вводимого ОВА.

Одновременная иммунизация мышей ОВА и дсРНК в дозах 50, 100 или 200 мкг/мышь приводила к усилению иммунного ответа на антиген. Наибольший прирост титров антител наблюдался при введении дсРНК мышам, иммунизированным наименьшей дозой ОВА — 1 мкг/мышь (табл. 1). Эффект стимуляции возрастал при увеличении дозы дсРНК с 50 до 100 мкг/мышь: среднегеометрические титры повышались с 689 731 до 1 678 033. Дальнейшее повышение дозы препарата дсРНК к увеличению показателя не приводило.

Результаты оценки уровня гуморального иммунного ответа у мышей, иммунизированных субстанцией вакцины ЭВК без адьюванта гидроокиси алюминия индивидуально или в сочетании с препаратом дсРНК, представлены в табл. 2. Иммунизация мышей субстанцией ЭВК в интервале от 0,25 до 2 человеческих доз (56,25–450 мкг белка на мышь) вызывала дозозависимую наработку специфических антител со среднегеометрическими титрами от

Таблица 1. Показатели СГТ специфических антител к ОВА в сыворотке крови мышей после двукратной иммунизации ОВА или совместно ОВА и дсРНК

Table 1. Average geometric titers of specific antibodies against OVA in the blood serum of mice after a two-time immunization with OVA, or OVA plus dsRNA

ОВА, мкг/мышь OVA, µg/mouse	СГТ после введения ОВА AGT after administration of OVA	СГТ после введения ОВА и дсРНК (мкг/мышь) AGT after administration of OVA and dsRNA (µg/mouse)					
		50		100		200	
		СГТ AGT	N	СГТ AGT	N	СГТ AGT	N
1	100	689 731	6897	1 678 033	16 780	717 879	7179
5	75 000	2 363 331	32	3 881 968	52	2 791 385	37
10	387 298	2 281 771	6	2 727 026	7	3 096 840	8
20	134 164	5 417 841	40	4 454 890	33	3 807 556	28

Примечание. Здесь и в табл. 2: N — кратность нарастания титров антител к ОВА в сыворотке крови мышей, иммунизированных ОВА в сочетании с дсРНК, по сравнению с показателем после введения только ОВА.

Note. Here and in the Table 2: AGT — average geometric titer of specific antibodies against OVA; N — multiplicity of titers of antibodies against OVA in the blood serum of mice immunized with OVA combined with dsRNA compared to administration of OVA alone.

Таблица 2. Показатели СГТ специфических антител к субстанции ЭВК в сыворотке крови мышей после двукратной иммунизации субстанцией ЭВК или совместно субстанцией ЭВК и дсРНК

Table 2. Average geometric titers of specific antibodies against EVC substance in the blood serum of mice after a two-time immunization with EVC substance, or EVC substance plus dsRNA

Доза ЭВК, мкг/мышь Dose of EVC, µg/mouse	СГТ после введения ЭВК AGT after administration of EVC	СГТ после введения ЭВК и дсРНК (мкг/мышь) AGT after administration of EVC and dsRNA (µg/mouse)					
		50		100		200	
		СГТ AGT	N	СГТ AGT	N	СГТ AGT	N
56,25	14 421	7 540 406	523	6 192 898	429	6 641 096	461
112,5	73 294	4 933 246	67	3 142 056	43	6 402 895	87
225	238 110	3 455 211	15	6 052 490	25	7 768 081	33
450	776 808	4 817 368	6	3 236 631	4	7 802 453	10

14 421 до 776 808. Совместное введение субстанции ЭВК и дсРНК приводило к увеличению интенсивности иммунного ответа. Наиболее высоким стимулирующий эффект дсРНК был в наименьшей из исследованных доз (50 мкг/мышь) при введении мышам, иммунизированным наименьшей дозой субстанции ЭВК (0,25 человеческой дозы/мышь).

Обсуждение

Эффективность вакцинного адъюванта в значительной степени зависит от типа вакцины, особенностей специфической иммунной реакции, которая формируется под её воздействием, и механизма действия самого адъюванта [23, 24]. Несмотря на то что любая иммунизация стимулирует развитие как гуморальной, так и клеточной иммунной реакции, существуют вакцины, которые воздействуют преимущественно на тот или иной тип иммунного ответа. И успех в выборе адъюванта в значительной степени определяется тем, способно ли данное вещество модулировать именно это критическое звено иммунитета.

В настоящее время получен значительный пул данных, описывающих особенности иммуномоду-

лирующего действия дсРНК — как синтетических, так и природных [25]. Предпринимались неоднократные и вполне успешные попытки использования синтетической дсРНК Poly(I:C) и её производных для усиления иммуногенности разного типа вакцин [26, 27]. При этом мало что известно относительно адьювантных свойств дсРНК, полученных биотехнологическими методами [25].

Одной из моделей, которые в настоящее время используются для изучения адьювантных свойств препаратов, является модель специфической иммунной реакции, индуцированной введением антигена ОВА. W. Zhang и соавт. использовали эту модель для подтверждения усиления гуморального иммунного ответа под действием фукоидана, полученного из морских водорослей *Macrocystis pyrifera* [28]. Повышение специфического иммунного ответа животных на ОВА, сопоставимое с эффектом гидроокиси алюминия, при включении в состав иммунных композиций экзополисахаридов морских бактерий описано Т.А. Кузнецовой и соавт. [29]. Полученные результаты позволили авторам обеих публикаций сделать вывод о том, что исследованные препараты могут быть перспектив-

ными в качестве эффективных вакцинных адъювантов [28, 29].

Результаты нашего исследования подтверждают тот факт, что препарат дсРНК способен многократно усиливать гуморальный иммунный ответ на ОВА и, следовательно, может быть использован для снижения прививочной дозы пептидных вакцин, основным механизмом действия которых является стимуляция Th2-иммунного ответа.

Ранее в ГНЦ ВБ «Вектор» была разработана вакцина на основе пептидных антигенов для профилактики COVID-19 «ЭпиВакКорона», в которой использован классический адъювант гидроксид алюминия [19]. Известно, что данный адъювант, несмотря на его широкое распространение, имеет ряд существенных недостатков. К ним можно отнести, в частности, то, что гидроксид алюминия стимулирует преимущественно гуморальное звено иммунитета и оказывает слабое воздействие на клеточный ответ, а также может вызывать развитие местной кожной реакции разной степени выраженности [23].

Для того чтобы выяснить возможность обеспечения высокой иммуногенности вакцины без побочных реакций за счёт использования в качестве адъюванта дсРНК, была использована мышьяная модель, где вместо антигена ОВА использовали субстанцию (полупродукт) вакцины «ЭпиВакКорона». Исследование показало, что иммуногенные свойства субстанции ЭВК были выше по сравнению с иммуногенными свойствами ОВА, но как в том, так и другом случае наблюдался эффект усиления иммунного ответа под действием дсРНК. Общей закономерностью являлось также то, что в обоих случаях стимулирующий эффект был тем более выраженным, чем ниже была доза антигена. Аналогичные дозовые зависимости наблюдали авторы работ [30, 31], показавшие, что наиболее демонстративно иммуноадъювантное действие препаратов рекомбинантных цитокинов человека на интенсивность иммунного ответа при вакцинации в случае использования малых доз антигена. Меньшие дозы антигена, используемые в сочетании с адъювантами, вызывали иммунный ответ, сопоставимый с ответом на большие дозы антигена, вводимые без иммуноадъювантов. Важно подчеркнуть, что на основании этих данных можно заключить, что введение адъювантов, аналогичных дсРНК, позволит существенным образом снизить эффективную прививочную дозу вакцин.

Полученные данные являются основанием для заключения о том, что включение препарата дсРНК в состав вакцинных композиций либо сочетанное их использование позволит снизить эффективную дозу вакцин на основе белковых и пептидных антигенов, одним из основных механизмов действия которых является стимуляция гуморального звена иммунного ответа.

Заключение

Результаты проведённого исследования свидетельствуют о наличии у препарата дрожжевой дсРНК адъювантных свойств, что позволяет рассматривать данный препарат в качестве потенциально-го адъюванта при создании пептидных вакцин.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Rizza P., Capone I., Moretti F., Proietti E., Belardelli F. IFN- α as a vaccine adjuvant: recent insights into the mechanisms and perspectives for its clinical use. *Expert. Rev. Vaccines*. 2011; 10(4): 487–98. <https://doi.org/10.1586/erv.11.9>
- Zhang C., Wang B., Wang M. GM-CSF and IL-2 as adjuvant enhance the immune effect of protein vaccine against foot-and-mouth disease. *Virolog. J.* 2011; 8: 7. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-7>
- Алпатов Н.А., Авдеева Ж.И., Мовсесянц А.А., Медуницын Н.В. Экспериментальное изучение роли цитокинов с целью повышения иммуногенной активности антирабических вакцин. *Иммунология*. 2018; 39(2-3): 143–51. <https://doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-2-3-143-151>
- Алпатов Н.А., Авдеева Ж.И., Никитина Т.Н., Медуницын Н.В. Адъювантные свойства цитокинов при вакцинации (Обзор). *Химико-фармацевтический журнал*. 2019; 53(11): 3–8. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2019-53-11-3-8>
- Авдеева Ж.И., Алпатов Н.А., Лысыкова С.Л., Гайдерава Л.А., Бондарев В.П. Анализ механизмов развития иммунного ответа при инфицировании вирусом гепатита В и способы повышения эффективности вакцинации. *Иммунология*. 2021; 42(4): 403–14. <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-3-403-414>
- Ma H., Lim T.H., Leerapun A., Weltman M., Jia J., Lim Y.S., et al. Therapeutic vaccine BR11-179 restores HBV-specific immune responses in patients with chronic HBV in a phase Ib/IIa study. *JHEP Rep.* 2021; 3(6): 100361. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2021.100361>
- Fan J., Jin S., Gilmartin L., Toth I., Hussein W.M., Stephenson R.J. Advances in Infectious Disease Vaccine Adjuvants. *Vaccines*. 2022; 10(7): 1120. <https://doi.org/10.3390/vaccines10071120>
- Randall R.E., Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.* 2008; 89(Pt. 1): 1–47. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83391-0>
- Devasthanam A.S. Mechanisms underlying the inhibition of interferon signaling by viruses. *Virulence*. 2014; 5(2): 270–7. <https://doi.org/10.4161/viru.27902>
- Ahmed-Hassan H., Abdul-Cader M.S., Ahmed Sabry M., Hamza E., Sharif S., Nagy E., et al. Double-stranded ribonucleic acid-mediated antiviral response against low pathogenic avian influenza virus infection. *Viral. Immunol.* 2018; 31(6): 433–46. <https://doi.org/10.1089/vim.2017.0142>
- Samuel C.E. Antiviral actions of interferons. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001; 14(4): 778–809. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.778-809.2001>
- Stadler D., Kächele M., Jones A.N., Hess J., Urban C., Schneider J., et al. Interferon-induced degradation of the persistent hepatitis B virus cccDNA form depends on ISG20. *EMBO Rep.* 2021; 22(6): e49568. <https://doi.org/10.15252/embr.201949568>
- Busnadiego I., Fernbach S., Pohl M.O., Karakus U., Huber M., Trkola A., et al. Antiviral activity of type I, II, and III interferons counterbalances ACE2 inducibility and restricts SARS-CoV-2. *mBio*. 2020; 11(5): e01928-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.01928-20>
- Bianchi F., Pretto S., Tagliabue E., Balsari A., Sfondrini L. Exploiting poly(I:C) to induce cancer cell apoptosis. *Cancer*

- Biol. Ther.* 2017; 18(10): 747–56.
<https://doi.org/10.1080/15384047.2017.1373220>
15. Scallan C.D., Tingley D.W., Lindbloom J.D., Toomey J.S., Tucker S.N. An adenovirus-based vaccine with a double-stranded RNA adjuvant protects mice and ferrets against H5N1 avian influenza in oral delivery models. *Clin. Vaccine Immunol.* 2013; 20(1): 85–94. <https://doi.org/10.1128/CVI.00552-12>
 16. Martins K.A., Steffens J.T., van Tongeren S.A., Wells J.B., Bergeron A.A., Dickson S.P., et al. Toll-like receptor agonist augments virus-like particle-mediated protection from Ebola virus with transient immune activation. *PLoS One.* 2014; 9(2): e89735. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089735>
 17. Uppu D.S.S.M., Turvey M.E., Sharif A.R.M., Bidet K., He Y., Ho V., et al. Temporal release of a three-component protein subunit vaccine from polymer multilayers. *J. Control. Release.* 2020; 317: 130–41.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.11.022>
 18. Wolferstätter M., Schweneker M., Späth M., Lukassen S., Klingenberg M., Brinkmann K., et al. Recombinant modified vaccinia virus Ankara generating excess early double-stranded RNA transiently activates protein kinase R and triggers enhanced innate immune responses. *J. Virol.* 2014; 88(24): 14396–411. <https://doi.org/10.1128/JVI.02082-14>
 19. Рыжиков А.Б., Рыжиков Е.А., Богрянцева М.П., Гаврилова Е.В., Даниленко Е.Д., Имамдинов И.Р. и др. Пептидные иммуногены и вакцинная композиция против коронавирусной инфекции COVID-19 с использованием пептидных иммуногенов. Патент РФ № 2738081 С1; 2020.
 20. Рыжиков А.Б., Рыжиков Е.А., Богрянцева М.П., Даниленко Е.Д., Имамдинов И.Р., Нечаева Е.А. и др. Иммуногенные и протективные свойства пептидной вакцины против SARS-CoV-2. *Вестник Российской академии медицинских наук.* 2021; 76(1): 5–19. <https://doi.org/10.15690/vramn1528>
 21. Дьяков А.В., Хрыкина И.С., Хегай А.А., Дьяченко И.А., Мурашев А.Н., Ивашев М.Н. Метод забора крови у животных. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* 2013; 11(2): 84–5.
 22. Рыбакова А.В., Макарова М.Н. Методы эвтаназии лабораторных животных в соответствии с Европейской Директивой 2010/63. *Международный вестник ветеринарии.* 2015; (2): 96–107.
 23. Алпатова Н.А., Авдеева Ж.И., Лысикова С.Л., Головинская О.В., Гайдерова Л.А. Общая характеристика адьювантов и механизм их действия (часть 1). *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2020; 20(4): 245–56. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-245-256>
 24. Firdaus F.Z., Skwarczynski M., Toth I. Developments in vaccine adjuvants. *Methods Mol. Biol.* 2022; 2412: 145–78. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1892-9_8
 25. Даниленко Е.Д., Белкина А.О., Сысоева Г.М. Создание лекарственных препаратов на основе высокополимерных двуспиральных РНК для противовирусной и противоопухолевой терапии. *Биомедицинская химия.* 2019; 65(4): 277–93. <https://doi.org/10.18097/PBMC20196504277>
 26. Martins K.A., Bavari S., Salazar A.M. Vaccine adjuvant uses of poly-IC and derivatives. *Expert. Rev. Vaccines.* 2015; 14(3): 447–59. <https://doi.org/10.1586/14760584.2015.966085>
 27. Jeong S.K., Heo Y.K., Jeong J.H., Ham S.J., Yum J.S., Ahn B.C., et al. COVID-19 subunit vaccine with a combination of TLR1/2 and TLR3 agonists induces robust and protective immunity. *Vaccines (Basel).* 2021; 9(9): 957. <https://doi.org/10.3390/vaccines9090957>
 28. Zhang W., Oda T., Yu Q., Jin J.O. Fucoidan from *Macrocystis pyrifera* has powerful immune-modulatory effects compared to three other fucoidans. *Mar. Drugs.* 2015; 13(3): 1084–104. <https://doi.org/10.3390/md13031084>
 29. Кузнецова Т.А., Персиянова Е.В., Иванушко Л.А., Смолина Т.П., Гажа А.К., Кокоулин М.С. и др. Иммуноадьювантная активность экзополисахаридов морских бактерий в условиях нормы и иммуносупрессии. *Антибиотики и химиотерапия.* 2021; 66(5-6): 17–22. <https://doi.org/10.24411/0235-2990-2021-66-5-6-17-22>
 30. Никитина Т.Н., Авдеева Ж.И. Иммуноадьювантное действие цитокинов при иммунизации животных вакциной против гепатита В. *Цитокины и воспаление.* 2009; 8(1): 28–31.
 31. Petrovsky N., Aguilar J.C. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunol. Cell Biol.* 2004; 82(5): 488–96. <https://doi.org/10.1111/j.0818-9641.2004.01272.x>

REFERENCES

1. Rizza P., Capone I., Moretti F., Proietti E., Belardelli F. IFN- α as a vaccine adjuvant: recent insights into the mechanisms and perspectives for its clinical use. *Expert. Rev. Vaccines.* 2011; 10(4): 487–98. <https://doi.org/10.1586/erv.11.9>
2. Zhang C., Wang B., Wang M. GM-CSF and IL-2 as adjuvant enhance the immune effect of protein vaccine against foot-and-mouth disease. *Viol. J.* 2011; 8: 7. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-7>
3. Alpatova N.A., Avdeeva Zh.I., Movsesyants A.A., Medunitsyn N.V. Experimental study of the role of cytokines to improve immunogenic activity of antirabic vaccines. *Immunologiya.* 2018; 39(2-3): 143–51. <https://doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-2-3-143-15> (in Russian)
4. Alpatova N.A., Avdeeva Zh.I., Nikitina T.N., Medunitsyn N.V. Adjuvant properties of cytokines in vaccination. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal.* 2019; 53(11): 3–8. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2019-53-11-3-8> (in Russian)
5. Avdeeva Zh.I., Alpatova N.A., Lysikova S.L., Gayderova L.A., Bondarev V.P. Analysis of the mechanisms of development of the immune response in hepatitis b virus infection and ways to improve the effectiveness of vaccination. *Immunologiya.* 2021; 42(4): 403–14. <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-3-403-414> (in Russian)
6. Ma H., Lim T.H., Leerapun A., Weltman M., Jia J., Lim Y.S., et al. Therapeutic vaccine BRII-179 restores HBV-specific immune responses in patients with chronic HBV in a phase Ib/IIa study. *JHEP Rep.* 2021; 3(6): 100361. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2021.100361>
7. Fan J., Jin S., Gilmartin L., Toth I., Hussein W.M., Stephenson R.J. Advances in Infectious Disease Vaccine Adjuvants. *Vaccines.* 2022; 10(7): 1120. <https://doi.org/10.3390/vaccines10071120>
8. Randall R.E., Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.* 2008; 89(Pt. 1): 1–47. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83391-0>
9. Devasthanam A.S. Mechanisms underlying the inhibition of interferon signaling by viruses. *Virulence.* 2014; 5(2): 270–7. <https://doi.org/10.4161/viru.27902>
10. Ahmed-Hassan H., Abdul-Cader M.S., Ahmed Sabry M., Hamza E., Sharif S., Nagy E., et al. Double-stranded ribonucleic acid-mediated antiviral response against low pathogenic avian influenza virus infection. *Viral. Immunol.* 2018; 31(6): 433–46. <https://doi.org/10.1089/vim.2017.0142>
11. Samuel C.E. Antiviral actions of interferons. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001; 14(4): 778–809. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.778-809.2001>
12. Stadler D., Kächele M., Jones A.N., Hess J., Urban C., Schneider J., et al. Interferon-induced degradation of the persistent hepatitis B virus cccDNA form depends on ISG20. *EMBO Rep.* 2021; 22(6): e49568. <https://doi.org/10.15252/embr.201949568>
13. Busnadiego I., Fernbach S., Pohl M.O., Karakus U., Huber M., Trkola A., et al. Antiviral activity of type I, II, and III interferons

- counterbalances ACE2 inducibility and restricts SARS-CoV-2. *mBio*. 2020; 11(5): e01928-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.01928-20>
14. Bianchi F., Pretto S., Tagliabue E., Balsari A., Sfondrini L. Exploiting poly(I:C) to induce cancer cell apoptosis. *Cancer Biol. Ther.* 2017; 18(10): 747–56. <https://doi.org/10.1080/15384047.2017.1373220>
 15. Scallan C.D., Tingley D.W., Lindbloom J.D., Toomey J.S., Tucker S.N. An adenovirus-based vaccine with a double-stranded RNA adjuvant protects mice and ferrets against H5N1 avian influenza in oral delivery models. *Clin. Vaccine Immunol.* 2013; 20(1): 85–94. <https://doi.org/10.1128/CVI.00552-12>
 16. Martins K.A., Steffens J.T., van Tongeren S.A., Wells J.B., Bergeron A.A., Dickson S.P., et al. Toll-like receptor agonist augments virus-like particle-mediated protection from Ebola virus with transient immune activation. *PLoS One*. 2014; 9(2): e89735. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089735>
 17. Uppu D.S.S.M., Turvey M.E., Sharif A.R.M., Bidet K., He Y., Ho V., et al. Temporal release of a three-component protein subunit vaccine from polymer multilayers. *J. Control. Release*. 2020; 317: 130–41. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.11.022>
 18. Wolferstätter M., Schwenecker M., Späth M., Lukassen S., Klingenberg M., Brinkmann K., et al. Recombinant modified vaccinia virus Ankara generating excess early double-stranded RNA transiently activates protein kinase R and triggers enhanced innate immune responses. *J. Virol.* 2014; 88(24): 14396–411. <https://doi.org/10.1128/JVI.02082-14>
 19. Ryzhikov A.B., Ryzhikov E.A., Bogryantseva M.P., Gavrilo-va E.V., Danilenko E.D., Imatdinov I.R. et al. Peptide immunogens and a vaccine composition against coronavirus infection COVID-19 using peptide immunogens. Patent RF № 2738081 C1; 2020. (in Russian)
 20. Ryzhikov A.B., Ryzhikov E.A., Bogryantseva M.P., Danilenko E.D., Imatdinov I.R., Nechaeva E.A., et al. Immunogenicity and protectivity of the peptide vaccine against SARS-COV-2. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2021; 76(1): 5–19. <https://doi.org/10.15690/vramn1528> (in Russian)
 21. Dyakon A.V., Khrykina I.S., Khegai A.A., Dyachenko I.A., Murashev A.N., Ivashev M.N. Blood sampling method from animals. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2013; 11(2): 84–5. (in Russian)
 22. Rybakova A.V., Makarova M.N. Methods of euthanasia of laboratory animals, in accordance with European directive 2010/63. *Mezhdunarodnyy vestnik veterinarii*. 2015; (2): 96–107. (in Russian)
 23. Alpatova N.A., Avdeeva Zh.I., Lysikova S.L., Golovinskaya O.V., Gayderova L.A. General Characteristics of Adjuvants and Their Mechanism of Action (Part 1). *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie*. 2020; 20(4): 245–56. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-245-256> (in Russian)
 24. Firdaus F.Z., Skwarczynski M., Toth I. Developments in vaccine adjuvants. *Methods Mol. Biol.* 2022; 2412: 145–78. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1892-9_8
 25. Danilenko E.D., Belkina A.O., Sysoeva G.M. Development of drugs based on high-polymeric double-stranded rna for antiviral and antitumor therapy. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2019; 65(4): 277–93. (in Russian) <https://doi.org/10.18097/PBMC20196504277>
 26. Martins K.A., Bavari S., Salazar A.M. Vaccine adjuvant uses of poly-IC and derivatives. *Expert. Rev. Vaccines*. 2015; 14(3): 447–59. <https://doi.org/10.1586/14760584.2015.966085>
 27. Jeong S.K., Heo Y.K., Jeong J.H., Ham S.J., Yum J.S., Ahn B.C., et al. COVID-19 subunit vaccine with a combination of TLR1/2 and TLR3 agonists induces robust and protective immunity. *Vaccines (Basel)*. 2021; 9(9): 957. <https://doi.org/10.3390/vaccines9090957>
 28. Zhang W., Oda T., Yu Q., Jin J.O. Fucoidan from *Macrocystis pyrifera* has powerful immune-modulatory effects compared to three other fucoidans. *Mar. Drugs*. 2015; 13(3): 1084–104. <https://doi.org/10.3390/md13031084>
 29. Kuznetsova T.A., Persiyanova E.V., Ivanushko L.A., Smolina T.P., Gazha A.K., Kokoulin M.S., et al. Immunoadjuvant activity of marine bacteria exopolysaccharides in normal and immunosuppressive conditions. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2021; 66(5-6): 17–22. <https://doi.org/10.24411/0235-2990-2021-66-5-6-17-22> (in Russian)
 30. Nikitina T.N., Avdeeva Zh.I. Adjuvant effect of cytokines during immunization of animals with hepatitis B vaccine. *Tsitokiny i vospalenie*. 2009; 8(1): 28–31. (in Russian)
 31. Petrovsky N., Aguilar J.C. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunol. Cell Biol.* 2004; 82(5): 488–96. <https://doi.org/10.1111/j.0818-9641.2004.01272.x>

Информация об авторах

Каплина Ольга Николаевна[✉] — с.н.с. отдела биологических исследований Института медицинской биотехнологии ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», Бердск, Россия, kaplina_on@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8624-4767>

Гамалей Светлана Георгиевна — зав. отделом биологических исследований Института медицинской биотехнологии ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», Бердск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7441-333X>

Иванова Ольга Сергеевна — к.б.н., н.с. отдела разработки технологий и пилотного производства биопрепаратов Института медицинской биотехнологии ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», Бердск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4242-3600>

Даниленко Елена Дмитриевна — к.б.н., директор Института медицинской биотехнологии ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», Бердск, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5026-1602>

Участие авторов. Каплина О.Н. — изучение адьювантной активности дсРНК, получение и анализ экспериментальных данных, написание статьи; Гамалей С.Г. — интерпретация результатов, редактирование статьи; Иванова О.С. — получение и характеристика субстанции дсРНК; Даниленко Е.Д. — постановка задачи, окончательное редактирование статьи. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Information about the authors

Olga N. Kaplina[✉] — senior researcher, Department of biological studies, Institute of Medical Biotechnology of the State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Berdsk, Russia, kaplina_on@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8624-4767>

Svetlana G. Gamaley — Head, Department of biological studies, Institute of Medical Biotechnology of the State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Berdsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7441-333X>

Olga S. Ivanova — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Department of development and pilot production of biologicals, Institute of Medical Biotechnology of the State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Berdsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4242-3600>

Elena D. Danilenko — Cand. Sci. (Biol.), director, Institute of Medical Biotechnology of the State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Berdsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5026-1602>

Author contribution. Kaplina O.N. — experimental study on dsRNA's adjuvant activity, acquisition and analysis of experimental data, article drafting; Gamaley S.G. — interpretation of the results, article revising; Ivanova O.S. — obtaining and characterization of dsRNA substance; Danilenko E.D. — aim setting, article final approval. 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.



Физиолого-биохимическая и генетическая характеристика конкурентных свойств штаммов *Escherichia coli* в кишечной микрофлоре пациентов с болезнью Крона и здоровых добровольцев

Синягина М.Н.[✉], Лайков А.В., Маркелова М.И., Булыгина Е.А., Хуснутдинова Д.Р., Абдулхаков С.Р., Григорьева Т.В.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Аннотация

Введение. Болезнь Крона (БК) характеризуется хроническим воспалением различных отделов желудочно-кишечного тракта и сопровождается увеличением доли *Escherichia coli*. Однако роль *E. coli* в развитии заболевания остаётся невыясненной.

Цель работы — оценить конкурентные свойства штаммов *E. coli*, выделенных из кишечника пациентов с БК и здоровых добровольцев, и выявить биохимические и генетические детерминанты, лежащие в их основе.

Материалы и методы. Антагонистическую активность оценивали путём совместного культивирования 11 клинических штаммов *E. coli*, способных ингибировать рост штамма K-12, с *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* и *Salmonella enterica*. Для выяснения механизма антагонистической активности проводили оценку биохимических свойств штаммов и сравнительный геномный анализ.

Результаты и обсуждение. В геномах 11 штаммов от пациентов с БК и здоровых добровольцев, проявивших антагонистическую активность в отношении штамма *E. coli* K-12, выявлены гены систем продукции бактериоцинов. Выявлены 3 штамма от здоровых добровольцев, ингибирующие рост нескольких представителей семейства *Enterobacteriaceae*. Биохимические возможности данных штаммов характерны для типичных представителей вида *E. coli*. Штаммы 1_34_12, активный в отношении *E. cloacae*, и 1_45_11, способный подавлять рост всех протестированных энтеробактерий, филогенетически родственны лабораторному штамму K-12. Штамм 1_39_1, активный в отношении *K. pneumoniae* и *S. enterica*, филогенетически близок пробиотическому штамму Nissle 1917 и содержит кластер генов биосинтеза колибактина и вариант гена *fimH*, повышающий адгезивную способность бактерий.

Заключение. Выявленные штаммы *E. coli* способны вытеснять энтеробактерии в экспериментах *in vitro* и могут быть использованы для дальнейшего изучения особенностей взаимодействия комменсалов друг с другом и с организмом хозяина, а также для понимания их роли в поддержании гомеостаза и развитии воспалительных реакций кишечника.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, болезнь Крона, микробиота, антагонистическая активность

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Казанского (Приволжского) федерального университета (протокол № 6 от 13.10.2017).

Благодарность. Авторы выражают благодарность заведующей кафедрой инфекционных болезней Казанского государственного медицинского университета, д.м.н., профессору И.В. Николаевой за предоставление изолята *Salmonella enterica*.

Источник финансирования. Работа выполнена за счёт средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения Государственного задания в сфере научной деятельности (проект № 0671-2020-0058).

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

Для цитирования: Синягина М.Н., Лайков А.В., Маркелова М.И., Булыгина Е.А., Хуснутдинова Д.Р., Абдулхаков С.Р., Григорьева Т.В. Физиолого-биохимическая и генетическая характеристика конкурентных свойств штаммов *Escherichia coli* в кишечной микрофлоре пациентов с болезнью Крона и здоровых добровольцев. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(6):669–681.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-192>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-192>

Competitive ability of *Escherichia coli* strains in the intestinal microbiota of patients with Crohn's disease and healthy volunteers: physiological, biochemical and genetic characteristics

Maria N. Siniagina[✉], Alexander V. Laikov, Maria I. Markelova, Eugenia A. Boulygina, Dilyara R. Khusnutdinova, Sayar R. Abdulkhakov, Tatyana V. Grigoryeva

Kazan Federal University, Kazan, Russia

Annotation

Introduction. Crohn's disease (CD) is a chronic inflammation of various parts of the gastrointestinal tract with an increased proportion of *Escherichia coli*. However, the role of *E. coli* in disease remains unclear.

This study **aims** to evaluate the competitive abilities of *E. coli* strains from CD patients and healthy volunteers, and to identify the biochemical and genetic determinants underlying these features.

Materials and methods. The antagonistic activity was assessed by co-cultivation of 11 clinical *E. coli* strains inhibiting the growth of the K-12, with *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumonia* and *Salmonella enterica*. To elucidate the mechanism of antagonistic activity, the evaluation of biochemical properties and a comparative genomic analysis were used.

Results and discussion. Genes of bacteriocin production systems were identified in genomes of 11 strains from CD patients and healthy volunteers active against the *E. coli* K-12 strain. Three strains from healthy individuals demonstrated activity against several *Enterobacteriaceae* bacteria. The strains' biochemical properties were typical of representatives of *E. coli*. Strains 1_34_12, active against *E. cloacae*, and 1_45_11, inhibiting all tested enterobacteria, are phylogenetically related to the laboratory strain K-12. Strain 1_39_1, active against *K. pneumonia* and *S. enterica*, is phylogenetically close to the Nissle1917, contains the genes for colibactin biosynthesis and a variant of the *fimH* gene that increases the adhesive ability of bacteria.

Conclusion. The identified *E. coli* strains are able to displace *Enterobacteriaceae* bacteria and can be used to study the bacteria-bacteria and host-bacteria interactions, to understand their role in gut homeostasis and intestinal inflammation.

Keywords: *Escherichia coli*, Crohn's disease, microbiota, antagonistic activity

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Kazan Federal University (protocol No. 6, October 16, 2017).

Acknowledgement. The authors express their gratitude to the Head of the Department of infectious diseases of the Kazan State Medical University, D. Sci. (Med.), Professor I.V. Nikolaeva for providing the *Salmonella enterica* isolate.

Funding source. The work was carried out at the expense of a subsidy allocated to Kazan Federal University for the implementation of the State task in the field of scientific activity (project No. 0671-2020-0058).

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

For citation: Siniagina M.N., Laikov A.V., Markelova M.I., Boulygina E.A., Khusnutdinova D.R., Abdulkhakov S.R., Grigoryeva T.V. Competitive ability of *Escherichia coli* strains in the intestinal microbiota of patients with Crohn's disease and healthy volunteers: physiological, biochemical and genetic characteristics. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(6):669–681.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-192>

Введение

Желудочно-кишечный тракт человека содержит таксономически и функционально сложную микробную экосистему [1]. Микроорганизмы, заселяющие кишечник, находятся в разнообразных взаимоотношениях как с макроорганизмом, так и между собой [2]. В условиях ограниченного пространства кишечника преимущественно обладают микроорганизмы, способные использовать одно или несколько питательных веществ более эффективно, чем его конкуренты [3]. У комменсалов развились различные механизмы, позволяющие им выживать и успешно колонизировать кишечник [4].

При конкуренции за использование ресурса без прямого взаимодействия между конкурентами организмы секретируют специализированные метаболиты, такие как бактериоцины [5], нацеленные, как правило, на близкородственные организмы. При прямом контактном взаимодействии важную роль играют системы, которым не нужны специфические мишени, — система контактзависимого ингибирования (contact-dependent growth inhibition — CDI) [6, 7] и система секреции 6-го типа (type 6 secretion system — T6SS) [8, 9]. Показано, что конкурентное вытеснение комменсалами микроорганизмов обеспечивает колонизационную резистентность

кишечника и защиту организма хозяина от патогенных микроорганизмов [10–12]. Однако нарушение гомеостаза под действием различных факторов (приём антибиотиков, бактериальная или вирусная инфекция, нарушения иммунной системы) могут приводить к дисбалансу, сопровождающемуся снижением разнообразия и сменой занимаемых экологических ниш бактериями, вызывая различные патологические процессы в кишечнике [13, 14].

Болезнь Крона (БК) — хроническое воспаление различных отделов желудочно-кишечного тракта, прогрессирующее с течением времени и характеризующееся чередой обострений и ремиссий [15, 16]. БК сопровождается нарушениями микробиоты, в частности увеличением доли *Escherichia coli*, однако определённые причины данного явления не выявлены. В то же время кишечная палочка является важным компонентом микробиоты и заселяет кишечник человека в течение 1-го года жизни [17, 18]. Предполагают, что патогенные штаммы используют альтернативные источники питания и занимают ниши, не занятые комменсальными бактериями [19]. Кроме того, рассматривают возможность проявления комменсальными штаммами *E. coli* патогенных свойств [20], поскольку бактерии содержат генетические детерминанты (факторы вирулентности), которые не только помогают им адаптироваться к новым условиям окружающей среды, но и воздействовать на организм человека, вызывая патологические процессы [21].

Цель данной работы — характеристика конкурентных свойств штаммов *E. coli*, выделенных из кишечника пациентов с БК и здоровых добровольцев, а также выявление биохимических и генетических детерминант, лежащих в их основе.

Материалы и методы

Нами проанализированы 11 штаммов *E. coli*, продемонстрировавших ранее ингибирующую активность в отношении *E. coli* K-12 substr. MG1655 [22] и входящих в коллекцию из 63 штаммов, выделенных из кала 32 людей (14 пациентов с БК и 18 здоровых добровольцев) и охарактеризованных нами ранее [22, 23]. Образцы кала были собраны в Университетской клинике Казанского (Приволжского) федерального университета (Медико-санитарная часть). Все пациенты были проинформированы об участии в исследовании и дали своё согласие. Исследование было рассмотрено и одобрено локальным этическим комитетом Казанского (Приволжского) федерального университета (протокол № 6 от 13.10.2017).

Для оценки антагонистической активности использовали представителей семейства *Enterobacteriaceae* — изоляты *Enterobacter cloacae* 3_222_2 и *Klebsiella pneumoniae* 3_219_1, выделенные из кала пациентов с БК, а также культуру *Salmonella*

enterica, предоставленную сотрудниками Республиканской клинической инфекционной больницы им. проф. А.Ф. Агафонова (Казань, Россия). Антагонистическую активность оценивали на плотной питательной среде согласно [24] с некоторыми модификациями. Для этого тестовую культуру бактерий смешивали с расплавленным 0,8% LB-агаром, наносили на 2% LB-агар и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре до полного затвердения. По 3 мкл исходной культуры каждого штамма *E. coli* (OD600 = 1,0) и её разведений в 10 и 100 раз наносили на подготовленные чашки с тестовой культурой и инкубировали в течение ночи при 37°C. Эксперимент проводили в 2 повторах. Активность считали антагонистической при раз- мере зон задержки роста тестовой культуры более 1 мм (рис. 1).

Биохимические реакции проводили с использованием коммерческого набора «ENTEROtest 24 N» («Lachema»), представляющего собой планшет с субстратами для определения утилизации аргинина, орнитина, лизина, малоната, салицина, сорбитола, мелибиозы, целлобиозы, лактозы, трегалозы, маннитола, дульцита, адонитола, арабитола, сахарозы, инозитола, раффинозы и эскулина, роста на цитрате Симмонса, наличия β-галактозидазы, β-глюкуронидазы, β-ксилоксидазы, уреазной активности и продукции сероводорода.

Штаммы *E. cloacae* и *K. pneumoniae* выделены нами из образцов фекалий пациентов с БК и являются потенциальными конкурентами *E. coli* в микробиоте кишечника. *S. enterica* служит причиной кишечных расстройств и опасна для здоровья человека. Интерпретация результатов теста по актив-ности

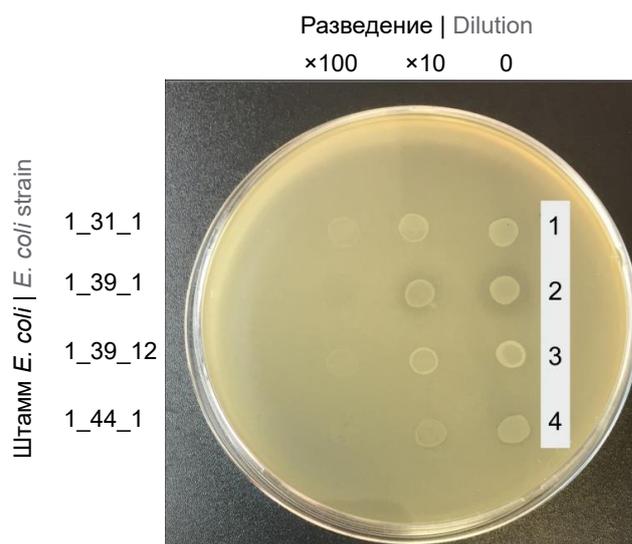


Рис. 1. Оценка антагонистической активности исследуемых штаммов *E. coli* на примере совместного культивирования с *E. coli* K-12 substr. MG1655.

Fig. 1. *E. coli* antagonistic activity evaluation using co-cultivation with *E. coli* K-12 substr. MG1655 as an example.

Таблица 1. Антагонистическая активность 11 штаммов *E. coli* в отношении представителей семейства *Enterobacteriaceae***Table 1.** Antagonistic activity of 11 *E. coli* strains against other members of *Enterobacteriaceae* family

Конкурентный штамм Competitive strain	Штамм <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> strain										
	1_18_1	1_25_1	1_25_14	1_34_12	1_39_1	1_45_11	36k_8	3_77_1	3_188_1	3_200_11	3_225_1
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumonia</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-

сти штаммов пациентов и здоровых людей затруднена ввиду большого разнообразия обнаруженных генов бактериоцинов у *E. coli* и непредсказуемого влияния их друг на друга. Поэтому для оценки был использован модельный лабораторный штамм *E. coli* K-12 substr. MG1655.

Поиск генов, кодирующих ферменты продукции бактериоцинов и колибактина, а также T6SS и CDI в геномах штаммов *E. coli* проводили путём выравнивания на нуклеотидные последовательности референсных генов с использованием BLASTn (идентичность не менее 80%, длина гена более 80%, $E < 10^{-16}$). Поиск нуклеотидных замен в гене *fimH* (адгезин) исследуемых штаммов проводили путём множественного выравнивания с использованием Clustal Omega¹. Последовательность гена *fimH* штамма *E. coli* K-12 substr. MG1655 была взята в качестве референсной. Последовательности полных геномов 63 штаммов, выделенных из образцов кала 32 людей (14 пациентов с БК и 18 здоровых добровольцев), загружены в NCBI (проект PRJNA560176).

Для филогенетического анализа последовательности геномов были загружены на платформу Type (Strain) Genome Server² [25]. При построении дерева использовали референсные геномы *E. coli* K-12 substr. MG1655 (GCF_904425475.1), *E. coli* Nissle 1917 (GCF_003546975.1), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* str. 92-0392 (GCF_002761055.1), *Enterobacter cloacae* GGT036 (GCF_000770155.1), *Klebsiella pneumonia* subsp. *pneumoniae* str. HS11286 (GCF_000240185.1), доступные в базе данных NCBI³. Парные сравнения всех геномных последовательностей производили с использованием метода Genome BLAST Distance Phylogeny (GBDP) и оценки точных межгеномных расстояний, подсчитанных с помощью алгоритма «trimming» и формулы расстояния d5 [26]. Полученные межгеномные расстояния были использованы для построения минимального дерева эволюции с поддержкой ветвей (с использованием 100 pseudo-bootstrap повторов) с по-

мощью программы FASTME 2.1.6.1 [27]. Филограмма была визуализирована с помощью PhyD3 [28].

Статистический анализ частоты встречаемости биохимических свойств и генов бактериоцинов проводили с помощью точного критерия Фишера; $p < 0,05$ принимали за уровень статистической достоверности.

Результаты и обсуждение

По результатам первичного скрининга 63 штаммов [22] антагонистическую активность в отношении лабораторного штамма *E. coli* K-12 substr. MG1655 проявили 11 штаммов: 4 — от пациентов с БК и 7 — от здоровых добровольцев ($p > 0,05$, точный критерий Фишера). В настоящей работе в качестве модели межвидовой конкуренции было проведено совместное культивирование данных штаммов с бактериями *E. cloacae*, *K. pneumonia* и *S. enterica*. Антагонистическую активность в отношении всех протестированных культур энтеробактерий проявили только штаммы, выделенные из фекалий здоровых добровольцев (табл. 1). В отношении *E. cloacae* были активны штаммы 1_34_12 и 1_45_11, рост *K. pneumonia* и *S. enterica* подавляли штаммы 1_39_1 и 1_45_11. Таким образом, были отобраны 3 штамма *E. coli* от здоровых добровольцев, проявившие способность вытеснять конкурентные микроорганизмы *in vitro*.

Микробиота кишечника в значительной степени детерминирована спектром питательных веществ, зависящих от диеты хозяина [29]. В ряде работ продемонстрированы различия в структуре микробиоты кишечника сельских и городских жителей [30, 31]. Питательные вещества в кишечнике варьируют во времени и пространстве [32], поэтому метаболическая гибкость и способность использовать разные субстраты являются важными стратегиями для выживания бактерий в условиях постоянных колебаний состава питательных веществ [33]. По результатам анализа биохимических свойств не выявлено статистически значимых различий в способности утилизировать субстраты среди штаммов от пациентов с БК и здоровых добровольцев. В обеих группах присутствовали штаммы, утилизирующие адонитол и арабитол, но не способные утили-

¹ URL: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

² URL: <https://tygs.dsmz.de>

³ URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (дата обращения: 01.07.2021).

зировать лактозу. Данные биохимические свойства являются редкими для *E. coli* и встречаются у 5% представителей вида согласно определителю бактерий Берджи [34]. Стоит отметить, что три штамма, способные подавлять рост *E. cloacae*, *K. pneumonia* и/или *S. enterica*, обладают типичными биохимическими свойствами, характерными для вида *E. coli*. Штаммы 1_45_11 и 1_34_12 способны ферментировать сорбит, лактозу, маннит, мелибиозу, трегалозу, а также обладают β-галактозидазной и β-глюкуронидазной активностью и содержат аргининдигидролазу и лизиндекарбоксилазу (рис. 2). Штамм 1_39_1, кроме того, способен утилизировать орнитин.

Согласно результатам подсчёта КОЕ, 8 из 11 штаммов доминируют в микробном сообществе кишечника участников исследования (табл. 2). Минорную долю в кишечном сообществе составляют штаммы 1_25_14 и 3_200_11, что, вероятно, связано с неспособностью утилизировать данными штаммами лактозу, являющуюся важнейшим источником

углерода для *E. coli* [34], а также штамм 3_225_1, который, как и штамм 3_200_11, не утилизирует мелибиозу. Можно предположить, что мелибиоза даёт конкурентное преимущество бактериям при колонизации кишечника.

В ходе анализа геномов у всех конкурентных штаммов обнаружены гены систем продукции бактериоцинов, дающих внутри- и межвидовое конкурентное преимущество при колонизации кишечника [5, 35] (табл. 3). Геномы штаммов пациентов с БК содержат полные кластеры генов продукции микроцинов J25 (штамм 3_77_1) и H47 (штамм 3_188_1), а также гены, необходимые для продукции колицинов А (штамм 3_200_11) и К (штамм 3_225_1). Штаммы здоровых добровольцев содержат полные кластеры генов продукции микроцинов С7 (штамм 1_39_1), В17 (штамм 36к_8), J25 (штамм 36к_8), H47 (штаммы 1_34_12, 1_39_1, 36к_8) и М (штамм 1_34_12), а также колицинов А (штаммы 1_25_1, 1_25_14, 1_34_12), В (штамм 3_77_1), Е1 (штамм

Штамм <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> strain	Биохимические свойства																							
	Лизин Lysin	β-Галактозидаза β-Galactosidase	Сорбитол Sorbitol	Трегалоза Trehalose	Маннитол Mannitol	β-Глюкуронидаза β-Glucuronidase	Аргинин Arginine	Мелибиоза Melibiose	Лактоза Lactose	Адонитол Adonitol	Арабитол Arabitol	Орнитин Ornithin	Раффиноза Raffinose	Сахароза Sucrose	Дульцит Dulcitol	Инозитол Inositol	Эскулин Aesculin	β-Ксилоксидаза β-Xyloxidase	Сероводород Hydrogen sulfide	Цитрат Симмонса Citrate (Simmons)	Малонат Malonate	Целлобиоза Cellobiose	Салицин Salicin	Уреаза Urea
1-18-1	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да
1-25-1	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да
1-25-14	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да
1-34-12	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да
1-39-1	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да
1-45-11	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да
36к-8	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да
3-77-1*	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да
3-188-1*	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да
3-200-11*	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да
3-225-1*	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да
K-12 substr.	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да
MG1655	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да

Да | Yes Нет | No

Рис. 2. Биохимические свойства клинических штаммов *E. coli*, проявивших антагонистическую активность в отношении представителей семейства *Enterobacteriaceae*.

*Штаммы от пациентов с БК. *E. coli* K-12 substr. MG1655 — контрольный штамм.

Fig. 2. Biochemical properties of clinical *E. coli* strains showing antagonistic activity against *Enterobacteriaceae*.

*Strains from patients with Crohn's disease. *E. coli* K-12 substr. MG1655 is a control strain.

Таблица 2. Доля штаммов, проявивших антагонистическую активность в отношении *E. coli* K-12, в кишечном сообществе участников исследования**Table 2.** The proportion of strains that showed antagonistic activity against *E. coli* K-12 in the intestinal community of study participants

Штамм <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> strain	Источник выделения штамма Source of strain isolation	Доля в сообществе, % Proportion in the community, %
1_18_1	Здоровый доброволец Healthy volunteer	96
1_25_1	Здоровый доброволец Healthy volunteer	97,3
1_25_14	Здоровый доброволец Healthy volunteer	0,8
1_34_12	Здоровый доброволец Healthy volunteer	79,5
1_39_1	Здоровый доброволец Healthy volunteer	95
1_45_11	Здоровый доброволец Healthy volunteer	84,5
36k_8	Здоровый доброволец Healthy volunteer	84,7
3_77_1	Пациент с БК CD patient	100
3_188_1	Пациент с БК CD patient	100
3_200_11	Пациент с БК CD patient	24
3_225_1	Пациент с БК CD patient	16

1_45_11), Ia (штамм 1_45_11), Ib (штамм 1_45_11), K (штамм 1_18_1) и M (штамм 1_45_11). Микроцин J25 неэффективен в отношении *E. cloacae*, *K. pneumonia* и *S. enterica* [36]. Кроме того, синтез микроцинов J25, I47 и H47 ингибируется в условиях культивирования на богатой питательной среде [37, 38], а синтез микроцина B17 индуцируется в условиях азотного голодания [39], что может объяснять неспособность штаммов 36k_8, 3_77_1 и 3_188_1, содержащих данные системы, подавлять рост *E. cloacae*, *K. pneumonia* и *S. enterica*. Таким образом, можно предположить, что активность штамма 1_39_1 в отношении *K. pneumonia* и *S. enterica* связана с кластером генов продукции микроцина C7, что соответствует данным литературы [40]. Способность штамма 1_34_12 ингибировать рост *E. cloacae* может быть опосредована системой продукции микроцина M. Интересно, что штамм 1_45_11 не содержит систем продукции микроцинов, однако ингибирует рост *S. enterica*, что, вероятно, связано с наличием у него генов колицинов Ia, Ib и M, которые, согласно данным литературы, эффективны в отношении сальмонелл [41]. Кроме того, в недавнем исследовании показано, что *E. coli*, содержащие гены продукции данных колицинов, подавляют рост *S. enterica* и *K. pneumoniae* [42].

Геномный анализ показал, что ни один из 11 штаммов не несёт кластеры генов систем прямого контактного взаимодействия CDI [7], а кластеры генов T6SS [43] обнаружены только в 1 штамме от здорового добровольца (36k_8). Поскольку данный штамм не содержит гены колицинов, а имеющиеся кластеры продукции микроцинов (B17, H47) неактивны на богатой питательной среде, использованной в исследовании, можно предположить, что конкуренция штамма с другими бактериями опосредована T6SS. Однако связь генов продукции

бактериоцинов и T6SS с антагонистической активностью требует дальнейшего подтверждения путём оценки экспрессии генов обнаруженных систем либо путём детекции конечного продукта.

Среди других факторов, ассоциированных с выживанием бактерий в сообществе, только у штамма 1_39_1 обнаружен кластер генов *pks*, необходимый для биосинтеза и транспорта колибактина — вторичного метаболита, описанного преимущественно для патогенных штаммов семейства *Enterobacteriaceae* [44–46] и индуцирующего двуцепочечные разрывы ДНК в эукариотических клетках [47]. Однако инактивация гена *clbA pks*-острова в геноме пробиотического штамма *E. coli* Nissle 1917 приводит к существенному ослаблению его терапевтических свойств [48].

Для оценки адгезивного потенциала 11 штаммов были изучены варианты гена адгезина *fimH*, способствующего прикреплению бактериальной клетки к эпителиоцитам, поскольку некоторые точечные мутации в гене *fimH* (G73A/E/R/W, T158A/P, R166C/H/S) ассоциированы с фенотипической адгезией бактерий [49]. Среди всех штаммов только в гене *fimH* штамма 1_39_1 была обнаружена замена R166C/H, дающая конкурентное преимущество при колонизации кишечника.

Проведён филогенетический анализ штаммов, подавляющих рост нескольких протестированных представителей семейства *Enterobacteriaceae*. Оказалось, что штаммы 1_34_12 и 1_45_11 филогенетически близки лабораторному штамму K-12 substr. MG1655, а штамм 1_39_1 родственен известному пробиотическому штамму Nissle 1917 (рис. 3).

Таким образом, в настоящем исследовании был проведён анализ микробных взаимодействий 11 клинических штаммов (4 от пациентов с БК и 7 от здоровых добровольцев) с некоторыми предста-

Таблица 3. Гены систем продукции бактериоцинов, обнаруженные у 11 штаммов *E. coli*, проявивших антагонистическую активность в отношении представителей семейства *Enterobacteriaceae*
Table 3. Genes for bacteriocin production systems found in *E. coli* strains that showed antagonistic activity against *Enterobacteriaceae*

Фактор Bacteriocin	Ген Gene	Функция Function	Штаммы <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> strain										
			от здоровых добровольцев from healthy individuals						от пациентов с БК from patients with CD				
			1_34_12	1_39_1	1_45_11	1_18_1	1_25_1	1_25_14	36k_8	3_77_1	3_188_1	3_200_11	3_225_1
Колицин Colicin													
A	<i>caa</i>	Колицин А (неполный) Colicin A (incomplete)	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
	<i>cai</i>	Иммунитет к колицину Colicin A immunity	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
B	<i>cba</i>	Колицин В Colicin B	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
	<i>cbi</i>	Иммунитет к колицину Colicin B immunity	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
E1	<i>sea</i>	Колицин E1 Colicin E1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>imm</i>	Иммунитет к колицину Colicin E1 immunity	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>lys</i>	Белок лизиса Lysis	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ia	<i>cia</i>	Колицин Ia Colicin Ia	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>iaa, imm</i>	Иммунитет к колицину Colicin Ia immunity	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ib	<i>cib</i>	Колицин Ib Colicin Ib	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
		Иммунитет к колицину Colicin Ib immunity	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
K	<i>cka</i>	Колицин K Colicin K	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
	<i>cki</i>	Иммунитет к колицину Colicin K immunity	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
	<i>ckl</i>	Белок лизиса Lysis	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
M	<i>cta</i>	Колицин M Colicin M	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
	<i>cti</i>	Иммунитет к колицину Colicin M immunity	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Микроцин Microcin													
Класс I Class I													
B17	<i>mcba</i>	Микроцин B17 Microcin B17	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	<i>mcbaG</i>	Иммунитет к микроцину Self-immunity	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
	<i>mcbaF</i>	Иммунитет к микроцину Self-immunity	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	<i>mcbaE</i>	Иммунитет к микроцину Self-immunity	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	<i>mcbaD</i>	Процессинг микроцина Processing	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	<i>mcbaC</i>	Процессинг микроцина Processing	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	<i>mcbaB</i>	Процессинг микроцина Processing	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
C7	<i>mcca</i>	Микроцин C7 Microcin C7	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>mccF</i>	Иммунитет к микроцину Self-immunity	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>mccD</i>	Посттрансляционные модификации Post-translation modifications	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>mccC</i>	Экспорт микроцина Export	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>mccE</i>	Посттрансляционные модификации Post-translation modifications	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>mccB</i>	Посттрансляционные модификации Post-translation modifications	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J25	<i>mcjA</i>	Микроцин J25 Microcin J25	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
	<i>mcjD</i>	Экспорт микроцина, иммунитет Export, self-immunity	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-

Продолжение табл. 3 | Continuation of the Table 3

Фактор Bacteriocin	Ген Gene	Функция Function	Штаммы <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> strain											
			от здоровых добровольцев from healthy individuals						от пациентов с БК from patients with CD					
			1_34_12	1_39_1	1_45_11	1_18_1	1_25_1	1_25_14	36k_8	3_77_1	3_188_1	3_200_11	3_225_1	
	<i>mcbB</i>	Процессинг микроцина Processing	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
	<i>mcbC</i>	Процессинг микроцина Processing	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Класс IIa Class IIa														
V	<i>cvaC</i>	Колицин V Colicin V	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
	<i>cvi</i>	Иммунитет к колицину Self-immunity	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>cvaB</i>	Синтез колицина Synthesis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>cvaA</i>	Секреция колицина Secretion	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Класс IIb Class IIb														
H47	<i>mchB</i>	Предшественник микроцина H47 Microcin H47 precursor	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
	<i>mchC</i>	Процессинг микроцина Processing	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
	<i>mchD</i>	Посттрансляционные модификации Post-translation modifications	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
	<i>mchE</i>	Секреция микроцина Secretion	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
	<i>mchF</i>	Секреция микроцина Secretion	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
	<i>mchX</i>	Регуляция экспрессии микроцина Regulation of expression	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
	<i>mchI</i>	Иммунитет к микроцину Self-immunity	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
I47	<i>mchS2</i>	Предшественник микроцина I47 Microcin I47 precursor	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
	<i>mchS3</i>	Белок иммунитета к микроцину Self-immunity	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
	<i>mchS4</i>	Регуляция экспрессии микроцина Regulation of expression	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
M	<i>mcmA</i>	Предшественник микроцина M Microcin M precursor	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>mcmI</i> / <i>mcmA</i>	Иммунитет к микроцину Self-immunity	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>mcmK</i>	Посттрансляционные модификации Post-translation modifications	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
	<i>mcmL</i>	Посттрансляционные модификации Post-translation modifications	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
	<i>mcmM</i>	Процессинг микроцина и экспорт Processing and export	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-

вителями семейства *Enterobacteriaceae*. В отличие от штаммов здоровых добровольцев, штаммы пациентов с БК не проявили антагонистической активности в отношении *E. cloacae*, *K. pneumonia* и *S. enterica*, несмотря на то что содержат гены, необходимые для продукции некоторых бактериоцинов, что, вероятно, связано с особенностями метода проведения анализа. Гены систем продукции бактериоцинов являются важными факторами колонизации кишечника бактерий и связаны с их пробиотическими свойствами [50]. В то же время данные

кластеры генов обнаружены в геномах патогенных штаммов [5, 51], а также у пациентов с БК [51], что было подтверждено в данном исследовании. Штаммы здоровых добровольцев, проявившие антагонистическую активность, содержат не только гены систем продукции бактериоцинов, но и T6SS, осуществляющих прямое контактное взаимодействие между бактериями. Кроме того, выявлены 3 штамма (1_34_12, 1_39_1 и 1_45_11), способные подавлять рост нескольких протестированных представителей энтеробактерий. Данные штаммы

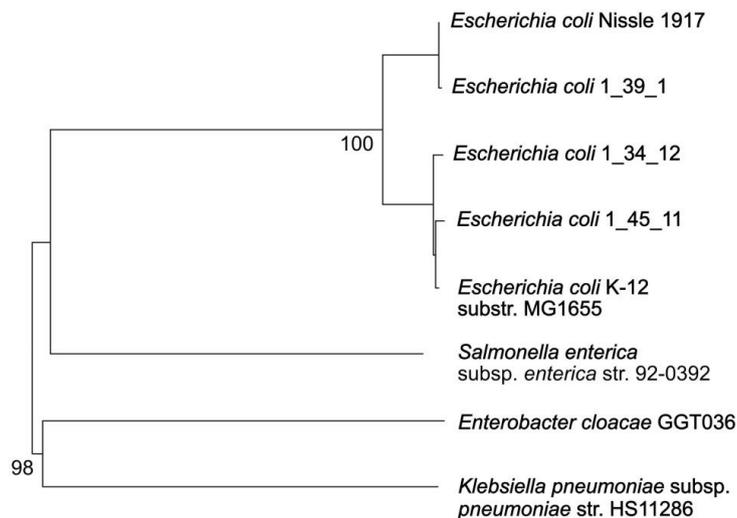


Рис. 3. Филограмма, построенная с помощью расстояний GBDP, рассчитанных на основе геномных последовательностей.

Цифры представляют собой значения поддержки pseudo-bootstrap GBDP > 60% из 100 повторов при средней поддержке ветвей 62,2%.

Fig. 3. Phylogram constructed using the GBDP distances calculated from genomic sequences.

Values in tree nodes represent pseudo-bootstrap GBDP support > 60% out of 100 repeats, with an average branch support of 62.2%.

обладают высоким конкурентным потенциалом и, вероятно, играют важную роль в колонизационной резистентности кишечника. Среди штаммов 1_34_12 и 1_45_11, филогенетически родственных штамму K-12 substr. MG1655, наибольший интерес представляет штамм 1_45_11, способный подавлять рост всех протестированных представителей энтеробактерий. Штамм 1_39_1, проявивший антагонистическую активность в отношении *K. pneumoniae* и *S. enterica*, оказался филогенетически родственным известному пробиотическому штамму Nissle 1917. Кроме того, он содержит мутацию в гене адгезина *fimH*, повышающую адгезивную способность бактерий, и кластер генов системы продукции колибактина, обнаруженный ранее у Nissle 1917 [48].

Заключение

На примере *E. coli* были продемонстрированы различия в конкурентном потенциале 11 филогенетически родственных штаммов, заселяющих кишечник пациентов с БК и здоровых добровольцев. Интересно, что способность вытеснять *in vitro* несколько представителей конкурентных энтеробактерий была обнаружена у штаммов, выделенных у здоровых добровольцев. Вероятно, данные штаммы обладают важными свойствами, необходимыми для обеспечения колонизационной резистентности кишечника человека. Анализ биохимических характеристик не продемонстрировал различий в способности утилизировать субстраты среди *E. coli* пациентов и здоровых добровольцев, однако выявил свойства, отсутствующие у минорной группы штаммов и, вероятно, необходимые бактериям для успешной конкуренции в сообществе. Кроме того, в обеих группах были идентифицированы редко встречающиеся среди кишечных палочек штаммы. Интересно, что высококонкурентные штаммы не обладают уникальными особенностями, которые могли бы давать штаммам преимущество при ко-

лонизации кишечника. Сравнительный геномный анализ позволил выявить генетические детерминанты, дающие конкурентные преимущества бактериям обеих исследованных групп, а также выявить некоторые характеристики геномов штаммов здоровых добровольцев, обладающих высоким конкурентным потенциалом. Для понимания роли *E. coli* в поддержании кишечного гомеостаза и развитии воспалительных реакций желудочно-кишечного тракта необходимо дальнейшее изучение комплекса взаимодействий штаммов друг с другом и с организмом хозяина.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Das B., Nair G.B. Homeostasis and dysbiosis of the gut microbiome in health and disease. *J. Biosci.* 2019; 44(5): 1–8. <https://doi.org/10.1007/s12038-019-9926-y>
2. Pessione E. The Russian doll model: how bacteria shape successful and sustainable inter-kingdom relationships. *Front. Microbiol.* 2020; 11: 2325. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.573759>
3. Freter R. Factors affecting the microecology of the gut. In: *Probiotics*. Dordrecht: Springer; 1992: 111–44. https://doi.org/10.1007/978-94-011-2364-8_6
4. Stubbendieck R.M., Straight P.D. Multifaceted interfaces of bacterial competition. *J. Bacteriol.* 2016; 198(6): 2145–55. <https://doi.org/10.1128/JB.00275-16>
5. Massip C., Oswald E. Siderophore-microcins in *Escherichia coli*: determinants of digestive colonization, the first step toward virulence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020; 10: 381. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00381>
6. Hayes C.S., Koskiniemi S., Ruhe Z.C., Poole S.J., Low D.A. Mechanisms and biological roles of contact-dependent growth inhibition systems. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2014; 4(2): a010025. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010025>
7. Aoki S.K., Pamma R., Hernday A.D., Bickham J.E., Braaten B.A., Low D.A. Contact-dependent inhibition of growth in *Escherichia coli*. *Science.* 2005; 309(5738): 1245–8. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010025>
8. Russell A.B., Peterson S.B., Mougous J.D. Type VI secretion system effectors: poisons with a purpose. *Nat. Rev. Microbiol.* 2014; 12(2): 137–48. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3185>
9. Anderson M.C., Vonaesch P., Saffarian A., Marteyn B.S., Sansonetti P.J. *Shigella sonnei* encodes a functional T6SS used for interbacterial competition and niche occupancy. *Cell Host Mi-*

- crobe*. 2017; 21(6):769–76.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.05.004>
10. Endt K., Stecher B., Chaffron S., Slack E., Tchitchek N., Bennecke A., et al. The microbiota mediates pathogen clearance from the gut lumen after non-typhoidal salmonella diarrhea *PLoS Pathog*. 2010; 6(9): e1001097.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001097>
 11. Kamada N., Seo S.U., Chen G.Y., Nunez G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease *Nat. Rev. Immunol.* 2013; 13(5): 321–35. <https://doi.org/10.1038/nri3430>
 12. Abt M.C., Pamer E.G. Commensal bacteria mediated defenses against pathogens. *Curr. Opin. Immunol.* 2014; 29: 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.03.003>
 13. Manichanh C., Rigottier-Gois L., Bonnaud E., Gloux K., Pelleret E., Frangeul L., et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*. 2006; 55(2): 205–11.
<https://doi.org/10.1136/gut.2005.073817>
 14. Dicksved J., Halfvarson J., Rosenquist M., Järnerot G., Tysk C., Arajalahti J., et al. Molecular analysis of the gut microbiota of identical twins with Crohn's disease. *ISME J.* 2008; 2(7): 716–27. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.37>
 15. Frank D.N., Amand A.L., Feldman R.A., Boedeker E.C., Harpaz N., Pace N.R. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007; 104(34): 13780–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706625104>
 16. Данилова Н.А., Абдулхаков С.Р., Григорьева Т.В., Маркелова М.И., Васильев И.Ю., Булыгина Е.А. и др. Маркеры дисбиоза у пациентов с язвенным колитом и болезнью Крона. *Терапевтический архив*. 2019; (4): 13–20.
<https://doi.org/10.26442/004036660.2019.04.000211>
 17. Hewitt J.H., Rigby J. Effect of various milk feeds on numbers of *Escherichia coli* and *Bifidobacterium* in the stools of new-born infants. *J. Hyg.* 1976; 77(1): 129–39.
<https://doi.org/10.1017/S0022172400055601>
 18. Бельский В.В., Московцева А.И. Колонизация *Escherichia coli* кишечника и частота выявления плазмидных факторов множественной лекарственной устойчивости и колициногенности у детей на протяжении первого года жизни. *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского*. 2007; 86(1): 20–4.
 19. Kamada N., Seo S.U., Chen G.Y., Nunez G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease *Nat. Rev. Immunol.* 2013; 13(5): 321–35. <https://doi.org/10.1038/nri3430>
 20. Leimbach A., Hacker J., Dobrindt U. *Escherichia coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2013; 358: 332.
https://doi.org/10.1007/82_2012_303
 21. Lapaquette P., Glasser A.L., Huett A., Xavier R.J., Darfeuille-Michaud A. Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. *Cell. Microbiol.* 2010; 12(1): 99–113.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01381.x>
 22. Siniagina M.N., Markelova M.I., Boulygina E.A., Laikov A.V., Khusnutdinova D.R., Abdulkhakov S.R., et al. Diversity and adaptations of *Escherichia coli* strains: exploring the intestinal community in Crohn's disease patients and healthy individuals. *Microorganisms*. 2021; 9(6): 1299.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9061299>
 23. Siniagina M., Markelova M., Laikov A., Boulygina E., Khusnutdinova D., Kharchenko A., et al. Cultivated *Escherichia coli* diversity in intestinal microbiota of Crohn's disease patients and healthy individuals: whole genome data. *Data Brief*. 2020; 28: 104948. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2019.104948>
 24. Ohno M., Hasegawa M., Hayashi A., Caballero-Flores G., Al-teri C.J., Lawley T.D., et al. Lipopolysaccharide O structure of adherent and invasive *Escherichia coli* regulates intestinal inflammation via complement C3. *PLoS Pathog*. 2020; 16(10): e1008928. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008928>
 25. Meier-Kolthoff J.P., Göker M. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nat. Commun.* 2019; 10(1): 2182.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-10210-3>
 26. Meier-Kolthoff J.P., Auch A.F., Klenk H-P., Göker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinform.* 2013; 14: 60.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-60>
 27. Lefort V., Desper R., Gascuel O. FastME 2.0: A comprehensive, accurate, and fast distance-based phylogeny inference program. *Mol. Biol. Evol.* 2015; 32(10): 2798–800.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msv150>
 28. Kreft L., Botzki A., Coppens F., Vandepoele K., Van Bel M. PhyD3: A phylogenetic tree viewer with extended phyloXML support for functional genomics data visualization. *Bioinform.* 2017; 33(18): 2946–7.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx324>
 29. David L.A., Maurice C.F., Carmody R.N., Gootenberg D.B., Button J.E., Wolfe B.E., et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2014; 505(7484): 559–63. <https://doi.org/10.1038/nature12820>
 30. De Filippo C., Cavalieri D., Di Paola M., Ramazzotti M., Poullet J.B., Massart S., et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010; 107(33): 14691.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1005963107>
 31. Tyakht A.V., Alexeev D.G., Popenko A.S., Kostryukova E.S., Govorun V.M. Rural and urban microbiota: to be or not to be? *Gut Microbes*. 2014; 5(3): 351–6.
<https://doi.org/10.4161/gmic.28685>
 32. Donaldson G.P., Lee S.M., Mazmanian S.K. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* 2016; 14(1): 20–32. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3552>
 33. Pereira F.C., Berry D. Microbial nutrient niches in the gut. *Environ. Microbiol.* 2017; 19(4): 1366–78.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.13659>
 34. Garrity G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria*. Springer Science & Business Media; 2007.
 35. Bingle L.E., Bailey C.M., Pallen M.J. Type VI secretion: a beginner's guide. *Curr. Opin. Microbiol.* 2008; 11(1): 3–8.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.01.006>
 36. Pomares M.F., Delgado M.A., Corbalán N.S., Fariás R.N., Vincent P.A. Sensitization of microcin J25-resistant strains by a membrane-permeabilizing peptide. *App. Environ. Microbiol.* 2010; 76(20): 6837–42. <https://doi.org/10.1128/AEM.00307-10>
 37. Laviña M.A., Gaggero C., Moreno F. Microcin H47, a chromosome-encoded microcin antibiotic of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1990; 172(11): 6585–8.
<https://doi.org/10.1128/jb.172.11.6585-6588.1990>
 38. Chiuchio M.J., Delgado M.A., Fariás R.N., Salomón R.A. Growth-phase-dependent expression of the cyclopeptide antibiotic microcin J25. *J. Bacteriol.* 2001; 183(5): 1755–64.
<https://doi.org/10.1128/JB.183.5.1755-1764.2001>
 39. Connell N., Han Z., Moreno F., Kolter R. An *E. coli* promoter induced by the cessation of growth. *Mol. Microbiol.* 1987; 1(2): 195–201. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1987.tb00512.x>
 40. Kurepina N.E., Basyuk E.I., Melitskaya A.Z., Zaitsev D.A., Khmel I.A. Cloning and mapping of the genetic determinants for microcin C51 production and immunity. *Mol. Gen. Genet.* 1993; 241(5-6): 700–6. <https://doi.org/10.1007/BF00279914>
 41. Schneider T., Hahn-Löbmann S., Stephan A., Schulz S., Giritich A., Naumann M., et al. Plant-made *Salmonella* bacteriocins salmocins for control of *Salmonella* pathogens. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 1–0. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22465-9>
 42. Mushtaq H., Bakht J., Khan I., Ahmad B. Antimicrobial efficacy and prevalence of colicinogenic *E. coli* in faecal matter of human, cow and sheep. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2021; 57(1): 106221. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106221>

43. Sassone-Corsi M., Nuccio S.P., Liu H., Hernandez D., Vu C.T., Takahashi A.A., et al. Microcins mediate competition among *Enterobacteriaceae* in the inflamed gut. *Nature*. 2016; 540(7632): 280–3. <https://doi.org/10.1038/nature20557>
44. Johnson J.R., Johnston B., Kuskowski M.A., Nougayrede J.P., Oswald E. Molecular epidemiology and phylogenetic distribution of the *Escherichia coli* pks genomic island. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46(12): 3906–11. <https://doi.org/10.1128/JCM.00949-08>
45. Putze J., Hennequin C., Nougayrède J.P., Zhang W., Homburg S., Karch H., et al. Genetic structure and distribution of the colibactin genomic island among members of the family *Enterobacteriaceae*. *Infect. Immun.* 2009; 77(11): 4696–703. <https://doi.org/10.1128/IAI.00522-09>
46. Suresh A., Ranjan A., Jadhav S., Hussain A., Shaik S., Alam M., et al. Molecular genetic and functional analysis of pks-harboring, extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* from India. *Front. Microbiol.* 2018; 9: 2631. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02631>
47. Nougayrède J.P., Homburg S., Taieb F., Boury M., Brzuszkiewicz E., Gottschalk G., et al. *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science*. 2006; 313(5788): 848–51. <https://doi.org/10.1126/science.1127059>
48. Olier M., Marçq L., Salvador-Cartier C., Secher T., Dobrindt U., Boury M., et al. Genotoxicity of *Escherichia coli* Nissle 1917 strain cannot be dissociated from its probiotic activity. *Gut Microb.* 2012; 3(6): 501–9. <https://doi.org/10.4161/gmic.21737>
49. Dreux N., Denizot J., Martinez-Medina M., Mellmann A., Billig M., Kisiela D., et al. Point mutations in FimH adhesin of Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* enhance intestinal inflammatory response. *PLoS Pathog.* 2013; 9(1): e1003141. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003141>
50. Drider D. Gut microbiota is an important source of bacteriocins and their in situ expression can be explored for treatment of bacterial infections. *Prob. Antimicrob. Proteins*. 2021; 13(6): 1759–65. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09843-y>
51. Šmajš D., Mícenková L., Šmarda J., Vrba M., Ševčíková A., Vališová Z., et al. Bacteriocin synthesis in uropathogenic and commensal *Escherichia coli*: colicin E1 is a potential virulence factor. *BMC Microbiol.* 2010; 10: 288. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-288>
52. Mícenková L., Frankovičová L., Jaborníková I., Bosák J., Dítě P., Šmarda J., et al. *Escherichia coli* isolates from patients with inflammatory bowel disease: ExPEC virulence-and colicin-determinants are more frequent compared to healthy controls. *Int. J. Med. Microbiol.* 2018; 308(5): 498–504. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.04.008>
7. Aoki S.K., Pamma R., Hernday A.D., Bickham J.E., Braaten B.A., Low D.A. Contact-dependent inhibition of growth in *Escherichia coli*. *Science*. 2005; 309(5738): 1245–8. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010025>
8. Russell A.B., Peterson S.B., Mougous J.D. Type VI secretion system effectors: poisons with a purpose. *Nat. Rev. Microbiol.* 2014; 12(2): 137–48. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3185>
9. Anderson M.C., Vonaesch P., Saffarian A., Marteyn B.S., Sansonetti P.J. Shigella sonnei encodes a functional T6SS used for interbacterial competition and niche occupancy. *Cell Host Microbe*. 2017; 21(6):769–76. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.05.004>
10. Endt K., Stecher B., Chaffron S., Slack E., Tchitchek N., Bencke A., et al. The microbiota mediates pathogen clearance from the gut lumen after non-typhoidal salmonella diarrhea. *PLoS Pathog.* 2010; 6(9): e1001097. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001097>
11. Kamada N., Seo S.U., Chen G.Y., Nunez G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2013; 13(5): 321–35. <https://doi.org/10.1038/nri3430>
12. Abt M.C., Pamer E.G. Commensal bacteria mediated defenses against pathogens. *Curr. Opin. Immunol.* 2014; 29: 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.03.003>
13. Manichanh C., Rigottier-Gois L., Bonnaud E., Gloux K., Pelletier E., Frangeul L., et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*. 2006; 55(2): 205–11. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.073817>
14. Dicksved J., Halfvarson J., Rosenquist M., Järnerot G., Tysk C., Apajalahti J., et al. Molecular analysis of the gut microbiota of identical twins with Crohn's disease. *ISME J.* 2008; 2(7): 716–27. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.37>
15. Frank D.N., Amand A.L., Feldman R.A., Boedeker E.C., Harpaz N., Pace N.R. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2007; 104(34): 13780–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706625104>
16. Danilova N.A., Abdulkhakov S.R., Grigor'eva T.V., Markelova M.I., Vasil'ev I.Yu., Bulygina E.A., et al. Markers of dysbiosis in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2019; (4): 13–20. <https://doi.org/10.26442/00403660.2019.04.000211> (in Russian)
17. Hewitt J.H., Rigby J. Effect of various milk feeds on numbers of *Escherichia coli* and *Bifidobacterium* in the stools of new-born infants. *J. Hyg.* 1976; 77(1): 129–39. <https://doi.org/10.1017/S0022172400055601>
18. Bel'skiy V.V., Moskovtseva A.I. Colonization of *Escherichia coli* of the intestine and the frequency of detection of plasmid factors of multidrug resistance and colicinogenicity in children during the first year of life. *Pediatriya. Zhurnal im. G.N. Spensanskogo*. 2007; 86(1): 20–4. (in Russian)
19. Kamada N., Seo S.U., Chen G.Y., Nunez G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2013; 13(5): 321–35. <https://doi.org/10.1038/nri3430>
20. Leimbach A., Hacker J., Dobrindt U. *Escherichia coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2013; 358: 332. https://doi.org/10.1007/978-94-011-2364-8_6
21. Lapaquette P., Glasser A.L., Huett A., Xavier R.J., Darfeuille-Michaud A. Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. *Cell. Microbiol.* 2010; 12(1): 99–113. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01381.x>
22. Siniagina M.N., Markelova M.I., Boulygina E.A., Laikov A.V., Khusnutdinova D.R., Abdulkhakov S.R., et al. Diversity and adaptations of *Escherichia coli* strains: exploring the intestinal community in Crohn's disease patients and healthy individuals. *Microorganisms*. 2021; 9(6): 1299. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061299>

REFERENCES

23. Siniagina M., Markelova M., Laikov A., Boulygina E., Khusnutdinova D., Kharchenko A., et al. Cultivated *Escherichia coli* diversity in intestinal microbiota of Crohn's disease patients and healthy individuals: whole genome data. *Data Brief*. 2020; 28: 104948. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2019.104948>
24. Ohno M., Hasegawa M., Hayashi A., Caballero-Flores G., Alteri C.J., Lawley T.D., et al. Lipopolysaccharide O structure of adherent and invasive *Escherichia coli* regulates intestinal inflammation via complement C3. *PLoS Pathog*. 2020; 16(10): e1008928. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008928>
25. Meier-Kolthoff J.P., Göker M. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nat. Commun*. 2019; 10(1): 2182. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10210-3>
26. Meier-Kolthoff J.P., Auch A.F., Klenk H-P., Göker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinform*. 2013; 14: 60. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-60>
27. Lefort V., Desper R., Gascuel O. FastME 2.0: A comprehensive, accurate, and fast distance-based phylogeny inference program. *Mol. Biol. Evol*. 2015; 32(10): 2798–800. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv150>
28. Kreft L., Botzki A., Coppens F., Vandepoele K., Van Bel M. PhyD3: A phylogenetic tree viewer with extended phyloXML support for functional genomics data visualization. *Bioinform*. 2017; 33(18): 2946–7. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx324>
29. David L.A., Maurice C.F., Carmody R.N., Gootenberg D.B., Button J.E., Wolfe B.E., et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2014; 505(7484): 559–63. <https://doi.org/10.1038/nature12820>
30. De Filippo C., Cavalieri D., Di Paola M., Ramazzotti M., Poullet J.B., Massart S., et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2010; 107(33): 14691. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005963107>
31. Tyakht A.V., Alexeev D.G., Popenko A.S., Kostryukova E.S., Govorun V.M. Rural and urban microbiota: to be or not to be? *Gut Microbes*. 2014; 5(3): 351–6. <https://doi.org/10.4161/gmic.28685>
32. Donaldson G.P., Lee S.M., Mazmanian S.K. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat. Rev. Microbiol*. 2016; 14(1): 20–32. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3552>
33. Pereira F.C., Berry D. Microbial nutrient niches in the gut. *Environ. Microbiol*. 2017; 19(4): 1366–78. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13659>
34. Garrity G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria*. Springer Science & Business Media; 2007.
35. Bingle L.E., Bailey C.M., Pallen M.J. Type VI secretion: a beginner's guide. *Curr. Opin. Microbiol*. 2008; 11(1): 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.01.006>
36. Pomares M.F., Delgado M.A., Corbalán N.S., Fariás R.N., Vincent P.A. Sensitization of microcin J25-resistant strains by a membrane-permeabilizing peptide. *App. Environ. Microbiol*. 2010; 76(20): 6837–42. <https://doi.org/10.1128/AEM.00307-10>
37. Laviña M.A., Gaggero C., Moreno F. Microcin H47, a chromosome-encoded microcin antibiotic of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. 1990; 172(11): 6585–8. <https://doi.org/10.1128/jb.172.11.6585-6588.1990>
38. Chiuchiolo M.J., Delgado M.A., Fariás R.N., Salomón R.A. Growth-phase-dependent expression of the cyclopeptide antibiotic microcin J25. *J. Bacteriol*. 2001; 183(5): 1755–64. <https://doi.org/10.1128/JB.183.5.1755-1764.2001>
39. Connell N., Han Z., Moreno F., Kolter R. An *E. coli* promoter induced by the cessation of growth. *Mol. Microbiol*. 1987; 1(2): 195–201. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1987.tb00512.x>
40. Kurepina N.E., Basyuk E.I., Metlitskaya A.Z., Zaitsev D.A., Khmel I.A. Cloning and mapping of the genetic determinants for microcin C51 production and immunity. *Mol. Gen. Genet*. 1993; 241(5-6): 700–6. <https://doi.org/10.1007/BF00279914>
41. Schneider T., Hahn-Löbmann S., Stephan A., Schulz S., Giritich A., Naumann M., et al. Plant-made *Salmonella* bacteriocins salmocins for control of *Salmonella* pathovars. *Sci. Rep*. 2018; 8(1): 1–0. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22465-9>
42. Mushtaq H., Bakht J., Khan I., Ahmad B. Antimicrobial efficacy and prevalence of colicinogenic *E. coli* in faecal matter of human, cow and sheep. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2021; 57(1): 106221. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106221>
43. Sassone-Corsi M., Nuccio S.P., Liu H., Hernandez D., Vu C.T., Takahashi A.A., et al. Microcins mediate competition among *Enterobacteriaceae* in the inflamed gut. *Nature*. 2016; 540(7632): 280–3. <https://doi.org/10.1038/nature20557>
44. Johnson J.R., Johnston B., Kuskowski M.A., Nougayrede J.P., Oswald E. Molecular epidemiology and phylogenetic distribution of the *Escherichia coli* pks genomic island. *J. Clin. Microbiol*. 2008; 46(12): 3906–11. <https://doi.org/10.1128/JCM.00949-08>
45. Putze J., Hennequin C., Nougayrede J.P., Zhang W., Homburg S., Karch H., et al. Genetic structure and distribution of the colibactin genomic island among members of the family *Enterobacteriaceae*. *Infect. Immun*. 2009; 77(11): 4696–703. <https://doi.org/10.1128/IAI.00522-09>
46. Suresh A., Ranjan A., Jadhav S., Hussain A., Shaik S., Alam M., et al. Molecular genetic and functional analysis of pks-harboring, extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* from India. *Front. Microbiol*. 2018; 9: 2631. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02631>
47. Nougayrede J.P., Homburg S., Taieb F., Boury M., Brzuszkiewicz E., Gottschalk G., et al. *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science*. 2006; 313(5788): 848–51. <https://doi.org/10.1126/science.1127059>
48. Olier M., Marcq I., Salvador-Cartier C., Secher T., Dobrindt U., Boury M., et al. Genotoxicity of *Escherichia coli* Nissle 1917 strain cannot be dissociated from its probiotic activity. *Gut Microb*. 2012; 3(6): 501–9. <https://doi.org/10.4161/gmic.21737>
49. Dreux N., Denizot J., Martinez-Medina M., Mellmann A., Billig M., Kisiela D., et al. Point mutations in FimH adhesin of Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* enhance intestinal inflammatory response. *PLoS Pathog*. 2013; 9(1): e1003141. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003141>
50. Drider D. Gut microbiota is an important source of bacteriocins and their in situ expression can be explored for treatment of bacterial infections. *Prob. Antimicrob. Proteins*. 2021; 13(6): 1759–65. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09843-y>
51. Šmajš D., Mícenková L., Šmarda J., Vrba M., Ševčíková A., Vališová Z., et al. Bacteriocin synthesis in uropathogenic and commensal *Escherichia coli*: colicin E1 is a potential virulence factor. *BMC Microbiol*. 2010; 10: 288. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-288>
52. Mícenková L., Frankovičová L., Jaborníková I., Bosák J., Dítě P., Šmarda J., et al. *Escherichia coli* isolates from patients with inflammatory bowel disease: ExPEC virulence-and colicin-determinants are more frequent compared to healthy controls. *Int. J. Med. Microbiol*. 2018; 308(5): 498–504. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.04.008>

Информация об авторах

Синягина Мария Николаевна[✉] — н.с. НИЛ «Омиксные технологии» Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, Казань, Россия, marias25@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8138-9235>

Лайков Александр Владимирович — н.с. НИЛ «Омиксные технологии» Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, <https://orcid.org/0000-0002-4250-2645>

Маркелова Мария Ивановна — н.с. НИЛ «Омиксные технологии» Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, <https://orcid.org/0000-0001-7445-2091>

Булыгина Евгения Александровна — н.с. НИЛ «Омиксные технологии» Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, <https://orcid.org/0000-0003-3458-1176>

Хуснутдинова Диляра Рашидовна — н.с. НИЛ «Омиксные технологии» Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, <https://orcid.org/0000-0002-9982-9059>

Абдулхакوف Сайяр Рустамович — к.м.н., зав. каф. фундаментальных основ клинической медицины, с.н.с. НИЛ «Омиксные технологии» Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, <https://orcid.org/0000-0001-9542-3580>

Григорьева Татьяна Владимировна — к.б.н., с.н.с. НИЛ «Омиксные технологии» Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, <https://orcid.org/0000-0001-5314-7012>

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 26.08.2022;
принята к публикации 01.11.2022;
опубликована 30.12.2022

Information about the authors

Maria N. Siniagina[✉] — researcher, Research laboratory “Omics technologies”, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia, marias25@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8138-9235>

Alexander V. Laikov — researcher, Research laboratory “Omics technologies”, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4250-2645>

Maria I. Markelova — researcher, Research laboratory “Omics technologies”, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7445-2091>

Eugenia A. Boulygina — researcher, Research laboratory “Omics technologies”, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3458-1176>

Dilyara R. Khusnutdinova — researcher, Research laboratory “Omics technologies”, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9982-9059>

Sayar R. Abdulkhakov — Cand. Sci. (Med.), Head, Department of fundamentals of clinical medicine, Kazan Federal University, Kazan, Russia; senior researcher, Research laboratory “Omics technologies”, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9542-3580>

Tatyana V. Grigoryeva — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Research laboratory “Omics technologies”, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5314-7012>

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 26.08.2022;
accepted for publication 01.11.2022;
published 30.12.2022

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-255>

Сравнительный анализ структуры и экспрессии регуляторного гена *vasH* системы секреции 6-го типа токсигенных и нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae*

Заднова С.П.[✉], Плеханов Н.А., Спирина А.Ю., Крицкий А.А.

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

Аннотация

Цель работы — сравнительный анализ структуры регуляторного гена *vasH* системы секреции 6-го типа и его экспрессии в токсигенных и нетоксигенных штаммах *Vibrio cholerae* O1 серогруппы El Tor биовара.

Материалы и методы. В работе использовали 35 штаммов, выделенных от больных и из внешней среды с 1970 по 2017 г. на территории России и Украины. Анализ структуры гена *vasH* и аминокислотной последовательности белка проводили с применением программ UGENE 1.32, MEGA X, BioEdit v. 7.0.9.0. Относительный уровень экспрессии *vasH* изучали методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Результаты. Установлено, что у токсигенных типичных штаммов и геновариантов *V. cholerae* O1 El Tor биовара (генотип *ctxA+tcpA+*) структура гена *vasH* и аминокислотная последовательность белка *VasH* идентична референс-штамму *V. cholerae* N16961 O1 El Tor биовара. У изолятов, не имеющих гены *ctxA* и *tcpA* (*ctxA-tcpA-*), последовательность *vasH* является вариативной, у *ctxA-tcpA+* (за исключением одного штамма) — не отличается от референсного. Изученные токсигенные типичные штаммы и геноварианты имеют схожий относительный уровень экспрессии гена *vasH*. У изолятов, не содержащих гены *ctxA* и *tcpA*, экспрессия данного гена сопоставима с токсигенными, а у *ctxA-tcpA+* штаммов в среднем в 3,1 раза выше, чем у *ctxA-tcpA-*, и в 2,14–2,60 раза больше, чем у токсигенных.

Заключение. На модели токсигенных и нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара, изолированных в разные периоды текущей пандемии холеры на территории России и Украины, подтверждены данные зарубежных исследователей о наличии интактного гена *vasH* у токсигенных и вариативного у изолятов, не имеющих гены *ctxA* и *tcpA*. В то же время показано, что у 99% изученных *ctxA-tcpA+* штаммов структура *vasH* идентична токсигенным. Экспрессия гена *vasH* обнаружена у всех изученных штаммов, при этом наибольшей она была у *ctxA-tcpA+*. Выявлено всего два нетоксигенных штамма, предположительно синтезирующих функционально неактивный белок *VasH*.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, система секреции 6-го типа, структура и экспрессия регуляторного гена *vasH*

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» (протокол № 16 от 21.02.2022).

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: Заднова С.П., Плеханов Н.А., Спирина А.Ю., Крицкий А.А. Сравнительный анализ структуры и экспрессии регуляторного гена *vasH* системы секреции 6-го типа токсигенных и нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(6):682–691.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-255>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-255>

Comparative analysis of the structure and expression of the *vasH* regulatory gene of type VI secretion system in toxigenic and non-toxigenic *Vibrio cholerae* strains

Svetlana P. Zadnova[✉], Nikita A. Plekhanov, Alina Yu. Spirina, Andrey A. Kritskiy

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russia

Abstract

Objective. The comparative analysis of the structure of the regulatory gene *vasH* of the type VI secretion system and its expression in toxigenic and non-toxigenic *V. cholerae* O1, biovar El Tor strains.

Materials and methods. We used 35 strains isolated from patients and from the environmental samples in the territory of Russia and Ukraine between 1970 and 2017. Analysis of the structure of the *vasH* gene and the amino acid sequence of the protein was carried out using Ugene 1.32, Mega X, and Bioedit v. 7.0.9.0. The relative level of *vasH* expression was studied by $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Results. The structure of the *vasH* gene and the amino acid sequence of VasH protein in toxigenic typical strains and genovariants of *V. cholerae* O1, El Tor biovar (genotype *ctxA+tcpA+*) have been shown to be identical to the reference *V. cholerae* n16961 O1, El Tor biovar strain. The *vasH* sequence is variable in isolates lacking *ctxA* and *tcpA* genes (*ctxA-tcpA-*), and does not differ from the reference in *ctxA-tcpA+* (with the exception of one strain). The studied toxigenic typical strains and the genovariants have a similar relative level of expression of the *vasH* gene. In isolates that do not contain the *ctxA* and *tcpA* genes, the expression of this gene is comparable to toxigenic strains, and is 3.1 times higher in *ctxA-tcpA+* strains than that of *ctxA-tcpA-* and 2.14–2.6 times higher than that of toxigenic ones.

Conclusion. The analysis of toxigenic and non-toxigenic *V. cholerae* O1, biovar El Tor strains isolated in Russia and Ukraine in different periods of the current cholera pandemic confirmed the data of foreign researchers on *vasH* gene being intact in toxigenic isolates and variable in isolates lacking *ctxA* and *tcpA* genes. Meanwhile, the structure of *vasH* gene has been shown to be identical to that of toxigenic ones in 99% of the studied *ctxA-tcpA+* strains. The expression of the *vasH* gene has been detected in all studied strains, being the highest in *ctxA-tcpA+* strains. Only two non-toxigenic strains presumably synthesizing the functionally inactive VasH protein have been identified.

Keywords: *Vibrio cholerae*, type VI secretion system, structure and expression of *vasH* regulatory gene

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe" (protocol No. 16, February 21, 2022).

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: Zadnova S.P., Plekhanov N.A., Spirina A.Yu., Kritskiy A.A. Comparative analysis of the structure and expression of the *vasH* regulatory gene of type VI secretion system in toxigenic and non-toxigenic *Vibrio cholerae* strains. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(6):682–691.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-255>

Введение

Возбудителями холеры — особо опасной инфекционной болезни с диарейным синдромом — являются токсигенные штаммы *Vibrio cholerae*, содержащие гены *ctxAB* и *tcpA-F*, кодирующие основные факторы патогенности: соответственно, холерный токсин, вызывающий развитие профузной диареи, и токсин-регулируемые пили адгезии, необходимые для первого этапа инфекционного процесса — прикрепления вибрионов к эпителиоцитам кишечника [1]. С 1961 г. продолжается седьмая пандемия холеры, вызванная типичными токсигенными штаммами *V. cholerae* O1 серогруппы El Tor биовара. Постоянно происходящие эволюционные преобразования El Tor вибрионов привели к появлению в 1990-х гг. генетически изменённых штаммов (геновариантов) *V. cholerae* O1 El Tor биовара с повышенной вирулентностью [2]. Геноварианты быстро вытеснили на эндемичной территории типичные штаммы и явились причиной ряда крупных вспышек холеры в разных странах [3–5]. Типичные штаммы *V. cholerae* O1 El Tor биовара неоднократно завозились и на территорию России, а с 1993 г. все единичные случаи и вспышки холеры были вызваны геновариантами [6, 7].

Механизмы быстрого распространения геновариантов и замещения типичных штаммов до конца не установлены. В ряде работ показано, что геноварианты не только являются гипервирулентными, но и способны быстро адаптироваться при смене среды обитания [8–10]. Как известно, важная роль в повышении вирулентных и адаптационных свойств холерного вибриона принадлежит недавно обнаруженной системе секреции 6-го типа (T6SS, от англ. Type 6 secretion system) [11]. T6SS представляет собой контактзависимую макромолекулярную структуру, напоминающую шприц, с помощью которой грамотрицательные бактерии, включая *V. cholerae*, транслоцируют внутрь соседних клеток-мишеней токсичные белки-эффекторы. Холерный вибрион использует T6SS для уничтожения прокариотических и эукариотических клеток: бактерий разных видов, макрофагов, фагоцитирующих амёб, инфузорий, нематод. Активная экспрессия белков-эффекторов повышает выживаемость *V. cholerae* как *in vivo*, так и *in vitro* и даёт ему возможность эффективно конкурировать с бактериями, составляющими микробиом кишечника человека, а также с постоянными обитателями открытых водоёмов при его нахождении в составе биоплёнки во внешней среде [12, 13].

Первые сведения о T6SS *V. cholerae* получены при изучении штамма V52 O37 серогруппы, у которой данная система активна в лабораторных условиях [11]. В дальнейшем была исследована структура и функция генов T6SS у некоторых типичных токсигенных штаммов (N16961, C6706, A1552) *V. cholerae* O1 El Tor биовара, холерных вибрионов O139 серогруппы, ряда нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара и вибрионов nonO1/nonO139 серогруппы. В то же время функционирование T6SS у геновариантов *V. cholerae* O1 El Tor биовара изучено на единичных модельных штаммах [13–21].

Согласно данным литературы, гены, кодирующие белки T6SS *V. cholerae*, входят в состав одного большого и нескольких дополнительных (Aux-1, Aux-2, Aux-3, Aux-4, Aux-5) кластеров, расположенных на первой и второй хромосомах *V. cholerae* [11, 15, 19, 21]. При этом токсигенные штаммы *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп содержат одинаковый набор — большой кластер и три дополнительных (Aux-1, Aux-2, Aux-3). У нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара и штаммов nonO1/nonO139 серогруппы состав и структура генов T6SS являются переменными [19, 22].

На большом кластере находятся гены, кодирующие структурные компоненты T6SS системы, а также ген *vasH* (VCA0117), ответственный за биосинтез регуляторного белка VasH, который непосредственно контролирует транскрипцию генов, кодирующих эффекторные белки, расположенные на дополнительных кластерах [11, 23]. В штаммах *V. cholerae*, лишённых гена *vasH*, T6SS является неактивной [23, 24]. Учитывая важную роль белка VasH в функционировании T6SS, **цель** нашей работы состояла в проведении сравнительного анализа структуры регуляторного гена *vasH* системы секреции 6-го типа и его экспрессии в токсигенных и нетоксигенных штаммах *V. cholerae* O1 серогруппы El Tor биовара.

Материалы и методы

Штаммы бактерий

В работе использовали 35 штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы El Tor биовара: токсигенные типичные и геноварианты, содержащие гены *ctxA* и *tcpA* (генотип *ctxA+tcpA+*); нетоксигенные, не имеющие ген *ctxA*, но включающие ген *tcpA* (*ctxA-tcpA+*), и нетоксигенные, лишённые гена *tcpA* (*ctxA-tcpA-*). Штаммы выделены от больных и из внешней среды с 1970 по 2017 г. на территории России и Украины. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Российского научно-исследовательского противочумного

института «Микроб» (протокол № 16 от 21.02.2022). Штаммы хранились в лиофильно высушенном состоянии в «Государственной коллекции патогенных бактерий» (РосНИПЧИ «Микроб», Саратов). Для работы бактерии выращивали на пластинах LB агара при 37°C в течение 18–24 ч.

Анализ структуры гена *vasH* и аминокислотной последовательности белка *VasH*

Изучение структуры регуляторного гена *vasH* проводили путём сравнения нуклеотидных последовательностей полных геномов исследуемых штаммов, представленных в NCBI GenBank, с последовательностью референс-штамма *V. cholerae* N16961 O1 серогруппы El Tor биовара с использованием программ «UGENE v. 1.32» и «MEGA X» («Megasoftware»). Аминокислотную последовательность белка VasH устанавливали с применением freeware-программы «BioEdit v. 7.0.9.0» («BioEdit»).

Изучение экспрессии гена *vasH*

Для изучения экспрессии гена *vasH* штаммы выращивали 4 ч с аэрацией в LB-бульоне при 37°C. Относительный уровень экспрессии гена *vasH* определяли методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ с использованием полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени [25]. Для выделения тотальной РНК применяли набор «SV Promega Total RNA Isolation System» («Promega»), для синтеза кДНК на матрице РНК — набор реагентов «Реверта-Л» («АмплиСенс»). Для ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени с интеркалирующим красителем использовали комплект реагентов «Thermo Scientific Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix» («Thermo Fisher Scientific») согласно инструкции производителя. Нормализацию полученных данных осуществляли относительно гена домашнего хозяйства *recA* (VC0543). Последовательности олигонуклеотидных праймеров к гену *recA* рассчитаны ранее [26], к гену *vasH* взяты из литературных источников [23]. В качестве штамма-калибратора, значение экспрессии целевого гена *vasH* которого было принято за единицу, был произвольно выбран штамм *V. cholerae* M818. Эксперимент проводили в 3 повторах.

Статистический анализ

Статистический анализ полученных экспериментальных данных осуществляли при помощи программ «Microsoft Excel» (стандартный пакет программ «Microsoft Office 2010») и «Statistica 6.0» («Statsoft») путём вычисления среднего арифметического, стандартной ошибки среднего арифметического и доверительного интервала. Достоверность различия между средними величинами оценивали при помощи критерия Стьюдента, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Изучение структуры гена *vasH*

На первом этапе работы было проведено сравнительное исследование нуклеотидной последовательности гена *vasH* у токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара. Произвольно были выбраны 5 типичных штаммов (M1062, M888, M893, 818, M1011) и 13 геновариантов (M1270, M1275, M1293, P17644, M1327, M1344, M1429, RND18826, P-18899, L3226, 89, M1509, 3265/80), выделенных, соответственно, в 1970–1972 и 1993–2014 гг. В результате анализа установлено, что у всех взятых в исследование токсигенных штаммов структура гена *vasH* идентична референс-штамму *V. cholerae* N16961 O1 El Tor биовара (таблица).

Далее были изучены нетоксигенные штаммы *V. cholerae*, изолированные с 1981 по 2017 г. от больных, а также из открытых водоёмов при проведении мониторинговых исследований на холеру. Нетоксигенные штаммы включали две группы: изоляты первой содержали ген *tcpA*, кодирующий токсин-корегулируемые пили адгезии (*ctxA-tcpA+*), у второй данный ген отсутствовал (*ctxA-tcpA-*). Наличие и структура мобильных элементов с генами патогенности и эпидемичности в данных штаммах изучена

ранее [27]. При анализе нетоксигенных штаммов установлено, что клинические и водные *ctxA-tcpA+* изоляты, как и токсигенные штаммы, имели интактный ген *vasH*. Исключение составил штамм *V. cholerae* 866 (Ялта, 1996), у которого в начале гена в позиции 55 был делегирован нуклеотид (С) (таблица). У штаммов, не имеющих гены *ctxA* и *tcpA*, структура гена *vasH* была вариабельной, выявлено 6–18 единичных нуклеотидных замен. Несмотря на присутствие значительного количества однонуклеотидных полиморфизмов, они в большинстве были синонимичными. Несинонимичные замены выявлены у 4 штаммов (M1332, 433, 132, M1526). У штамма *V. cholerae* M1337 (Астрахань, 2000), кроме однонуклеотидных полиморфизмов, в позиции 1341–1352 обнаружена делеция 12 нуклеотидов (таблица).

Аминокислотная последовательность белка *VasH*

Согласно данным литературы, белок *VasH* включает 530 аминокислот и функционально разделён на три участка: N-терминальный регуляторный (1–187), воспринимающий сигналы внешней среды; центральный (193–414) и С-терминальный (485–525) с ДНК-связывающим НТН (496–512) доменом.

Структура и относительный уровень экспрессии гена *vasH* в штаммах *V. cholerae* O1 El Tor биовара
Structure and relative level of expression of the *vasH* gene in strains of *V. cholerae* O1 El Tor biovar

№ No.	Штамм <i>V. cholerae</i> <i>V. cholerae</i> strain	Место; год; источник выделения штамма The site, year and source of isolation strains	Структура гена <i>vasH</i> * <i>vasH</i> * gene structure	Относительный уровень экспрессии гена <i>vasH</i> Relative level of <i>vasH</i> gene expression
Токсигенные типичные штаммы Toxigenic typical strains				
1.	M1062 ^{SSAB01}	Россия, Астрахань; 1970; человек Russia, Astrakhan; 1970; patient	инт int	0,23 ± 0,015
2.	M888 ^{LRBH01}			0,4 ± 0,02
3.	M893 ^{SSAA01}			0,05 ± 0,001
4.	M818 ^{LAHM01}	Россия, Балаково; 1970; человек Russia, Balakovo; 1970; patient	инт int	1,0**
5.	M1011 ^{SSAC01}	Россия, Уфа; 1972; человек Russia, Ufa; 1972; patient	инт int	Не определяли Not identified
Токсигенные генетически изменённые штаммы Toxigenic altered strains				
6.	M1270 ^{VXCC01}	Россия, Набережные Челны; 1993; человек Russia, Naberezhnye Chelny; 1993; patient	инт int	0,51 ± 0,02
7.	M1275 ^{LRAF01}	Россия, Дагестан; 1993; человек Russia, Dagestan; 1993; patient	инт int	0,40 ± 0,025
8.	M1293 ^{JFFW01}	Россия, Дагестан; 1994; человек Russia, Dagestan; 1994; patient	инт int	0,14 ± 0,015
9.	R17644 ^{JRTW01}	Россия, Ачинск; 1997; человек Russia, Achinsk; 1997; patient	инт int	1,0 ± 0,04
10.	M1327 ^{LRFE01}	Россия, Дагестан; 1998; человек Russia, Dagestan; 1998; patient	инт int	0,63 ± 0,01
11.	M1344 ^{NEDY01}	Россия, Казань; 2001; человек Russia, Kazan; 2001; patient	инт int	0,34 ± 0,015
12.	M1429 ^{LAEM01}	Россия, Белорецк; 2004; человек Russia, Beloretsk; 2004; patient	инт int	0,29 ± 0,025

Окончание таблицы | End of the Table

№ No.	Штамм <i>V. cholerae</i> <i>V. cholerae</i> strain	Место; год; источник выделения штамма The site, year and source of isolation strains	Структура гена <i>vasH</i> * <i>vasH</i> * gene structure	Относительный уровень экспрессии гена <i>vasH</i> Relative level of <i>vasH</i> gene expression
13.	RND18826 ^{AYOM01}	Россия, Тверь; 2005; человек Russia, Tver; 2005; patient	ИНТ int	0,72 ± 0,015
14.	P-18899 ^{LAKM01}	Россия, Мурманск; 2006; человек Russia, Murmansk; 2006; patient	ИНТ int	1,09 ± 0,035
15.	L3226 ^{DVX01}	Россия, Москва; 2010; человек Russia, Moscow; 2010; patient	ИНТ int	0,07 ± 0,001
16.	89 ^{NDXR01}	Украина, Ялта; 2010; внешняя среда Ukraine, Yalta; 2010; environmental sample	ИНТ int	0,16 ± 0,015
17.	M1509 ^{NEDZ01}	Россия, Москва; 2012; человек Russia, Moscow; 2012; patient	ИНТ int	0,49 ± 0,02
18.	3265/80 ^{JRQL01}	Россия, Москва; 2014; человек Russia, Moscow; 2014; patient	ИНТ int	0,6 ± 0,03
Нетоксигенные <i>ctxA</i>–<i>tcpA</i>+ штаммы Non-toxigenic <i>ctxA</i>–<i>tcpA</i>+ strains				
19.	M1395 ^{LQBY01}	Россия, Астрахань; 1981; внешняя среда Russia, Astrakhan; 1981; environmental sample	ИНТ	2,13 ± 0,085
20.	56 ^{MWRD01}	Украина, Мариуполь; 1995; внешняя среда Ukraine, Mariupol; 1995; environmental sample	ИНТ int	0,88 ± 0,06
21.	866 ^{MWRF01}	Украина, Ялта; 1996; внешняя среда Ukraine, Yalta; 1996; environmental sample	ΔC55	0,77 ± 0,005
22.	85 ^{NEDU01}	Украина, Бердянск; 1999; человек Ukraine, Berdyansk; 1999; patient	ИНТ int	0,30 ± 0,01
23.	P18778 ^{NIF01}	Россия, Ростов; 2005; человек Russia, Rostov; 2005; patient	ИНТ int	1,72 ± 0,03
24.	M1501 ^{LRAE01}	Россия, Элиста; 2011; человек Russia, Elista; 2011; patient	ИНТ int	1,75 ± 0,045
25.	M1518 ^{LQZR01}	Россия, Элиста; 2012; внешняя среда Russia, Elista; 2012; environmental sample	ИНТ int	0,64 ± 0,025
26.	M1524 ^{LQZS01}	Россия, Элиста; 2013; внешняя среда Russia, Elista; 2013; environmental sample	ИНТ int	Не определяли Not identified
27.	2613 ^{PYCA01}	Россия, Элиста; 2015; внешняя среда Russia, Elista; 2015; environmental sample	ИНТ int	0,50 ± 0,03
28.	124 ^{PYCD01}	Россия, Элиста; 2017; человек Russia, Elista; 2017; patient	ИНТ int	0,93 ± 0,01
Штаммы, не имеющие гены <i>ctxA</i> и <i>tcpA</i> Strains lacking <i>ctxA</i> and <i>tcpA</i> genes				
29.	M1332 ^{PYCE01}	Россия, Челябинск; 2000; человек Russia, Chelyabinsk; 2000; patient	3/18	0,50 ± 0,005
30.	M1337 ^{NEEB01}	Россия, Астрахань; 2000; человек Russia, Astrakhan; 2000; patient	0/8; Δ1341-1352	0,71 ± 0,045
31.	P-18748 ^{NIFH01}	Россия, Сочи; 2004; человек Russia, Sochi; 2004; patient	0/13	0,24 ± 0,005
32.	M1526 ^{VUAA01}	Россия, Элиста; 2012; внешняя среда Russia, Elista; 2012; environmental sample	1/6	0,21 ± 0,025
33.	132 ^{VUAC01}	Россия, Элиста; 2013; внешняя среда Russia, Elista; 2013; environmental sample	1/9	0,36 ± 0,035
34.	433 ^{NEDW01}	Россия, Сочи; 2015; внешняя среда Russia, Sochi; 2015; environmental sample	3/18	Не определяли Not identified
35.	3178 ^{PYCH01}	Россия, Элиста; 2017; внешняя среда Russia, Elista; 2017; environmental sample	0/8	0,07 ± 0,001

Примечание. В надстрочном индексе штаммов указан сокращённый код доступа в GenBank; инт — нуклеотидная последовательность идентична референс-штамму *V. cholerae* N16961 O1 El Tor биовара; * — цифры через черту (/) показывают количество несинонимичных замен/общее количество замен; ** — штамм-калибратор.

Note. In the superscript, the GenBank accession number is specified; int — nucleotide sequence is identical to the reference strain of *V. cholerae* N16961 O1, biovar El Tor; * — numbers separated with a slash (/) show the ratio of non-synonymous substitutions to total number of substitutions; ** — calibrator strain.

Белок VasH активен только при взаимодействии с альтернативной σ^{54} субъединицей (белок RpoN), связывание с которой происходит в центральном домене, где расположены Walker A (220–229) и Walker B (286–296) мотивы. Мутанты с делетированными НТН или Walker доменами синтезируют функционально неактивный белок VasH [11, 23, 24].

Изучение последовательности аминокислот в VasH белке у взятых в анализ штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара показало, что у всех токсигенных изолятов она идентична референс-штамму (таблица). У нетоксигенных *ctxA–tcpA+* штаммов, за исключением *V. cholerae* 866, последовательность аминокислот в VasH также была идентична референсному. Делеция одного нуклеотида в начале гена в штамме 866 привела к изменению всей аминокислотной последовательности белка (рисунок). Вполне вероятно, что синтезируемый данным штаммом белок-регулятор VasH будет функционально неактивным.

У штаммов P-18748 и 3178, имеющих только синонимичные замены, аминокислотная последо-

вательность VasH белка идентична референсному. В штамме M1337 в результате делеции большого участка гена значительно изменена карбоксильная область белка, затронувшая и НТН домен (рисунок). Подобные изменения приводят к биосинтезу белка, не способного взаимодействовать с генами-мишенями [23].

Несинонимичные однонуклеотидные полиморфизмы в штаммах *V. cholerae* M1526, 132, M1332 и 433 вызвали замены аминокислот в различных участках белковой молекулы VasH. В штамме M1526 в регуляторной аминотерминальной области вместо аспарагиновой кислоты включён гистидин (H116D). У штамма *V. cholerae* 132 в линкерной области между Walker A и Walker B доменами выявлен лизин (A267L). В штаммах M1332 и 433 в начале регуляторного N участка присутствует изолейцин (I14V), а не валин, как у референсного, а в линкерной области между σ^{54} -связывающим и НТН доменами произошла смена аминокислот S447P и V449A. Однако, по данным литературы, указанные замены не влияют на функциональные свойства белка VasH [23].

	10	20	30	40	50
ref	MSQWLAFATQ	LVGVRKSHQL	ALQFVDLLTQ	GLDLSDSL	LLLPSSDGRLLV
132	MSQWLAFATQ	LVGVRKSHQL	ALQFVDLLTQ	GLDLSDSL	LLLPSSDGRLLV
P-18748	MSQWLAFATQ	LVGVRKSHQL	ALQFVDLLTQ	GLDLSDSL	LLLPSSDGRLLV
866	MSQWLAFATQ	LVGVRKSHSL	RCNLLIC*LK	A*I*VIAFCC	CHRRMGVYLC
M1337	MSQWLAFATQ	LVGVRKSHQL	ALQFVDLLTQ	GLDLSDSL	LLLPSSDGRLLV
	260	270	280	290	300
ref	AAIPEHLLES	ELFGYCKGAF	SGADSDKQGL	IAQANGGTLF	LDEIGDMPLT
132	AAIPEHLLES	ELFGYCKGAF	SGADSDKQGL	IAQANGGTLF	LDEIGDMPLT
P-18748	AAIPEHLLES	ELFGYCKGAF	SGADSDKQGL	IAQANGGTLF	LDEIGDMPLT
866	RRSLSIYWKV	NCLVTAKGHF	LERTAINRDL	SHKRMVARYF	WMRSAICRSP
M1337	AAIPEHLLES	ELFGYCKGAF	SGADSDKQGL	IAQANGGTLF	LDEIGDMPLT
	410	420	430	440	450
ref	LKQYDFPGNV	RELKHLIEFG	CAQTADGTQV	EASCFAHRLQ	TLPCLAPEAT
132	LKQYDFPGNV	RELKHLIEFG	CAQTADGTQV	EASCFAHRLQ	TLPCLAPEAT
P-18748	LKQYDFPGNV	RELKHLIEFG	CAQTADGTQV	EASCFAHRLQ	TLPCLAPEAT
866	LSSTTSREMC	VS*NI*LSLA	ARKQRMVRRW	KLVALPIVYK	PYPVLRLLKRR
M1337	LKQYDFPGNV	RELKHLIEFG	CAQTADGTQV	EASCFAHRLQ	TLPCLAPEAT
	460	470	480	490	500
ref	PVAVSVETEN	VDLEPSVALA	GEPNFAVIHD	LKQAVSQFEA	LIISERLNRF
132	PVAVSVETEN	VDLEPSVALA	GEPNFAVIHD	LKQAVSQFEA	LIISERLNRF
P-18748	PVAVSVETEN	VDLEPSVALA	GEPNFAVIHD	LKQAVSQFEA	LIISERLNRF
866	R*PFLSKLRT	WILNPRRLWL	ENRILRLSMI	*NRRSVSLKR	*SSVSV*TAL
M1337	SVETENVLDLE	PSVALAGEPN	FAVIHDLKQA	VSQFEALIIS	ERLNRFAGDR
	510	520	530		
ref	AGDRAKAAS	LGIPKRTLAY	KCLKLEIKTP	*	
132	AGDRAKAAS	LGIPKRTLAY	KCLKLEIKTP	*	
P-18748	AGDRAKAAS	LGIPKRTLAY	KCLKLEIKTP	*	
866	LAIARKRRKV	SVLSVPWPT	SA*NWRSKPH	.	
M1337	AKAAKSLGIP	KRTLAYCLK	LEIKTP*	...	

Фрагменты аминокислотной последовательности белка VasH некоторых штаммов *V. cholerae*.
 ref — референс-штамм *V. cholerae* N16961 O1 El Tor биовара. Жирным шрифтом выделены изменённые участки.
 Fragments of the amino acid sequence of VasH protein of some *Vibrio cholerae* strains.
 ref — reference strain *V. cholerae* N16961 O1, El Tor biovar. Altered regions are highlighted in bold.

Уровень экспрессии гена *vasH*

Заключительный этап работы был посвящён определению у взятых в анализ штаммов относительного уровня экспрессии гена *vasH*. В результате значительные отличия между типичными штаммами *V. cholerae* O1 El Tor биовара и геновариантами по экспрессии данного гена не выявлены. У типичных штаммов среднее значение относительного уровня экспрессии гена *vasH* составило 0,42, у геновариантов — 0,5 (таблица). У изолятов, не имеющих гены *ctxA* и *tcpA*, экспрессия *vasH* также была невысокой (среднее значение 0,35). В то же время выявлено статистически достоверное ($p < 0,05$) различие в уровне экспрессии *vasH* у штаммов с генотипом *ctxA–tcpA+*. Они отличались повышенным уровнем экспрессии данного гена (среднее значение 1,07). Среди штаммов данной группы выявлены три (M1395, P18778, M1501), которые имели наиболее высокий уровень экспрессии гена *vasH* по сравнению с другими взятыми в работу штаммами (выделены жирным шрифтом в таблице).

Обсуждение

В ранее проведённой работе при сравнительном протеомном масс-спектрометрическом сканировании бактериальных лизатов клеток типичного штамма *V. cholerae* M1062 O1 El Tor биовара и геноварианта M1509, выращенных в LB-бульоне при 37°C, у последнего было обнаружено присутствие 2 белков T6SS [28]. Отсутствие биосинтеза белков T6SS в лабораторных условиях у типичного токсигенного штамма согласуется с данными литературы. У указанных штаммов T6SS активна только *in vivo* или при культивировании в определённых условиях — повышенная осмолярность среды с содержанием 300 мМ NaCl, сниженная до 26°C температура [17]. Обнаружение экспрессии белков T6SS у геноварианта позволило высказать предположение, что у данных штаммов изменился механизм регуляции T6SS и она стала активной при культивировании штаммов в лабораторных условиях. Проверку данной гипотезы мы начали с изучения структуры и экспрессии глобального регуляторного гена *vasH*. В результате установлено, что у всех изученных типичных штаммов и геновариантов *V. cholerae* O1 El Tor биовара нуклеотидная последовательность гена *vasH* идентична референс-штамму *V. cholerae* N16961 O1 El Tor биовара. Отличия между ними по экспрессии указанного гена также не выявлены (таблица). Видимо, указанные штаммы различаются по экспрессии других генов T6SS, но для проверки данного предположения необходимы дальнейшие исследования.

Кроме завезённых токсигенных штаммов, в работе были использованы штаммы *V. cholerae* O1 El Tor биовара, не имеющие гены *ctxA* и *tcpA* (таб-

лица). Важность исследования данных штаммов заключается в том, что при попадании в организм человека они не способны вызвать холеру, но могут быть причиной острых кишечных инфекций. Нетоксигенные штаммы ежегодно выделяются из водных объектов нашей страны при мониторинговых исследованиях. При этом механизмы их длительного сохранения во внешней среде до конца не изучены. Из литературных источников известно, что водные штаммы *V. cholerae* являются гетерогенной группой по составу и структуре генов T6SS [19, 22], которые активно экспрессируются в данных штаммах, что повышает их выживаемость во внешней среде [16, 29].

Проведённые нами исследования показали, что варибельным ген *vasH* был только у штаммов, не содержащих гены *ctxA* и *tcpA*; 90% взятых в анализ *ctxA–tcpA+* штаммов, подобно токсигенным, имели интактную последовательность гена *vasH* (таблица). При изучении экспрессии гена *vasH* с использованием ОТ-ПЦР в режиме реального времени выявлено, что относительный уровень экспрессии данного гена у *ctxA–tcpA+* штаммов в среднем в 3,1 раза выше, чем у изолятов, не имеющих гены *ctxA* и *tcpA*, а также в 2,6 и 2,14 раза больше, соответственно, чем у типичных штаммов и геновариантов. Именно среди *ctxA–tcpA+* штаммов выявлены 3 изолята (M1395, P18778, M1501), экспрессия *vasH* у которых была наибольшей (таблица). Для установления причины повышенной экспрессии *vasH* в *ctxA–tcpA+* штаммах нами был проведён анализ структуры гена *rpoS* (VC0534), кодирующего биосинтез σ^{54} -РНК полимеразы, необходимой для активации транскрипции *vasH* [23, 24]. Однако полученные сведения не позволили решить указанную проблему (данные не приводятся). Возможно, увеличение транскрипции *vasH* у *ctxA–tcpA+* штаммов может быть обусловлено изменениями в экспрессии гена *rpoS* или структуре и экспрессии негативных регуляторов *luxO* (VC1021) и *tsrA* (VC0070), блокирующих транскрипцию *vasH* [13, 15]. Планируется продолжение данных исследований.

Заключение

При сравнительном анализе токсигенных и нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара, изолированных на территории России и Украины с 1970 по 2017 г., подтверждены данные зарубежных исследователей о наличии интактного гена *vasH* у токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара и варибельного у штаммов, не содержащих гены *ctxA* и *tcpA*. В то же время в данной работе показано, что изученные нетоксигенные *ctxA–tcpA+* изоляты, как и токсигенные штаммы, имеют интактный ген *vasH*. Транскрипционная активность гена *vasH* выявлена у всех взятых в анализ штаммов, а наибольший уровень экспрессии данного гена отмечен

у *ctxA-tcpA*+ штаммов. Необходимо отметить, что среди изученных 35 штаммов обнаружено только два нетоксигенных изолята (866, M1337 — 5,7%), предположительно синтезирующих функционально неактивный белок VasH, что ещё раз указывает на важную роль данного регулятора в биологии *V. cholerae*.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Kaper J.B., Morris J., Levin M. Cholera. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; 8(1): 48–89. <https://doi.org/10.1128/CMR.8.1.48>.
2. Nair G.B., Faruque S.M., Bhuiyan N.A., Kamruzzaman M., Siddique A.K., Sack D.A. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(9): 3296–9. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.9.3296-3299.2002>
3. Chin C.S., Sorenson J., Harris J.B., Robins W.P., Charles R.C., Jean-Charles R.R., et al. The origin of the Haitian cholera outbreak strain. *N. Engl. J. Med.* 2011; 364(1): 33–42. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1012928>
4. Bundi M., Shah M.M., Odoyo E., Kathiiko C., Wandera E., Miring'u G., et al. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 isolates responsible for cholera outbreaks in Kenya between 1975 and 2017. *Microbiol. Immunol.* 2019; 63(9): 350–8. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12731>
5. Weill F.X., Domman D., Njamkepo E., Almesbahi A.A., Naji M., Nasher S.S., et al. Genomic insights into the 2016–2017 cholera epidemic in Yemen. *Nature.* 2019; 565(7738): 230–3. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0818-3>
6. Смирнова Н.И., Заднова С.П., Шашкова А.В., Кутырев В.В. Вариабельность генома измененных вариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль-Тор, изолированных на территории России в современный период. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2011; 26(3): 11–8.
7. Миронова Л.В., Балаханов С.В., Урбанович Л.Я., Половинкина В.С., Кожевникова А.С., Куликалова Е.С. и др. Обнаружение «гибридных» штаммов *Vibrio cholerae* eltor при эпидемических осложнениях в Сибири и на Дальнем Востоке. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2011; 88(5): 12–8.
8. Заднова С.П., Кульшань Т.А., Челдышова Н.Б., Крицкий А.А., Плеханов Н.А., Смирнова Н.И. Сравнительный анализ выживаемости типичных штаммов и геновариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор *in vitro* и *in vivo*. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2015; (4): 65–9. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2015-4-65-69>
9. Son M.S., Megli C.J., Kovacicova G., Qadri F., Taylor R.K. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype variant clinical isolates from Bangladesh and Haiti, including a molecular genetic analysis of virulence genes. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49(11): 3739–49. <https://doi.org/10.1128/JCM.01286-11>
10. Satchell K.J.F., Jones C.J., Wong J., Queen J., Agarwal S., Yildiz F.H. Phenotypic analysis reveals that the 2010 Haiti cholera epidemic is linked to a hypervirulent strain. *Infect. Immun.* 2016; 84(9): 2473–81. <https://doi.org/10.1128/IAI.00189-16>
11. Pukatzki S., Ma A.T., Sturtevant D., Krastins B., Sarracino D., Nelson W.C., et al. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2006; 103(5): 1528–33. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510322103>
12. Ma A.T., McAuley S., Pukatzki S., Mekalanos J.J. Translocation of a *Vibrio cholerae* type VI secretion effector requires bacterial endocytosis by host cells. *Cell. Host. Microbe.* 2009; 5(3): 234–43. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.02.005>
13. Joshi A., Kostiuk B., Rogers A., Teschler J., Pukatzki S., Yildiz F.H. Rules of engagement: the type VI secretion system in *Vibrio cholerae*. *Trends. Microbiol.* 2017; 25(4): 267–79. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.12.003>
14. Монахова Е.В., Божко Н.В. Изучение экспрессии контакт-зависимых систем секреции холерными вибрионами на модели *Dictyostelium discoideum*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2010; 87(4): 89–92.
15. Zheng J., Shin O.S., Cameron D.E., Mekalanos J.J. Quorum sensing and a global regulator TsrA control expression of type VI secretion and virulence in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2010; 107(49): 21128–33. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014998107>
16. Miyata S.T., Kitaoka M., Wieteska L., Frech C., Chen N., Pukatzki S. The *Vibrio cholerae* type VI secretion system: evaluating its role in the human disease cholera. *Front. Microbiol.* 2010; 1: 117. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00117>
17. Ishikawa T., Sabharwal D., Bröms J., Milton D.L., Sjöstedt A., Uhlin B.E., et al. Pathoadaptive conditional regulation of the type VI secretion system in *Vibrio cholerae* O1 strains. *Infect. Immun.* 2012; 80(2): 575–84. <https://doi.org/10.1128/IAI.05510-11>
18. Miyata S.T., Unterweger D., Rudko S.P., Pukatzki S. Dual expression profile of type VI secretion system immunity genes protects pandemic *Vibrio cholerae*. *PLoS Pathog.* 2013; 9(12): e1003752. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003752>
19. Unterweger D., Miyata S.T., Bachmann V., Brooks T.M., Mullins T., Kostiuk B., et al. The *Vibrio cholerae* type VI secretion system employs diverse effector modules for intraspecific competition. *Nat. Commun.* 2014; 5: 3549. <https://doi.org/10.1038/ncomms4549>
20. Townsley L., Mangus M.P.S., Mehic S., Yildiz F.H. Response of *Vibrio cholerae* to low temperature shifts: CspV regulation of type VI secretion, biofilm formation, and association with zooplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 2016; 82(14): 4441–52. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00807-16>.
21. Crisan C.V., Chande A.T., Williams K., Raghuram V., Rishishwar L., Steinbach G., et al. Analysis of *Vibrio cholerae* genomes identifies new type VI secretion system gene clusters. *Gen. Biol.* 2019; 20(1): 163. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1765-5>
22. Santoriello F.J., Michel L., Unterweger D., Pukatzki S. Pandemic *Vibrio cholerae* shuts down site-specific recombination to retain an interbacterial defence mechanism. *Nat. Commun.* 2020; 11(1): 6246. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20012-7>
23. Kitaoka M., Miyata S.T., Brooks T.M., Unterweger D., Pukatzki S. VasH is a transcriptional regulator of the type VI secretion system functional in endemic and pandemic *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2011; 193(23): 6471–82. <https://doi.org/10.1128/JB.05414-11>
24. Seibt H., Aung K.M., Ishikawa T., Sjöström A., Gullberg M., Atkinson G.C., et al. Elevated levels of VCA0117 (VasH) in response to external signals activate the type VI secretion system of *Vibrio cholerae* O1 El Tor A1552. *Environ. Microbiol.* 2020; 22(10): 4409–23. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15141>
25. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCt} method. *METHODS.* 2001; 25(4): 402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
26. Крицкий А.А., Челдышова Н.Б., Тучков И.В., Смирнова Н.И. Разработка алгоритма определения уровня экспрессии генов *ctxA* и *toxR* *Vibrio cholerae* методом ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2017; (3): 53–7. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-3-53-57>
27. Смирнова Н.И., Агафонова Е.Ю., Щелканова Е.Ю., Агафонов Д.А., Краснов Я.М., Ливанова Л.Ф. и др. Геномное

- разнообразие нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1, выделенных на территории России и сопредельных стран. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2018; 36(2): 76–84. <https://doi.org/10.18821/0208-0613-2018-36-2-76-84>
- Zadnova S.P., Badanin D.V., Pliexanov N.A., Polunina T.A., Kotova N.V., Kriczkij A.A. и др. Сравнительные протеомные профили типичного штамма и генетически измененного варианта *Vibrio cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; (3): 150–3. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-3-150-153>
 - Bernardy E.E., Turnsek M.A., Wilson S.K., Tarr C.L., Hammer B.K. Diversity of clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae* in natural transformation and contact-dependent bacterial killing indicative of type VI secretion system activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 2016; 82(9): 2833–42. <https://doi.org/10.1128/AEM.00351-16>
- #### REFERENCES
- Kaper J.B., Morris J., Levin M. Cholera. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; 8(1): 48–89. <https://doi.org/10.1128/CMR.8.1.48>
 - Nair G.B., Faruque S.M., Bhuiyan N.A., Kamruzzaman M., Siddique A.K., Sack D.A. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(9): 3296–9. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.9.3296-3299.2002>
 - Chin C.S., Sorenson J., Harris J.B., Robins W.P., Charles R.C., Jean-Charles R.R., et al. The origin of the Haitian cholera outbreak strain. *N. Engl. J. Med.* 2011; 364(1): 33–42. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1012928>
 - Bundi M., Shah M.M., Odoyo E., Kathiiko C., Wandera E., Miring'u G., et al. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 isolates responsible for cholera outbreaks in Kenya between 1975 and 2017. *Microbiol. Immunol.* 2019; 63(9): 350–8. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12731>
 - Weill F.X., Domman D., Njamkepo E., Almesbahi A.A., Naji M., Nasher S.S., et al. Genomic insights into the 2016–2017 cholera epidemic in Yemen. *Nature*. 2019; 565(7738): 230–3. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0818-3>
 - Smirnova N.I., Zadnova S.P., Shashkova A.V., Kutyrev V.V. Genome variability in the altered variants of *Vibrio cholerae* biovar El Tor isolated in Russia. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2011; 26(3): 102–10. <https://doi.org/10.3103/S0891416811030062>
 - Mironova L.V., Balakhonov S.V., Urbanovich L.Ya., Polovinkina V.S., Kozhevnikova A.S., Kulikalova E.S., et al. Detection of "hybrid" *Vibrio cholerae* El Tor strains during epidemic complications in Siberia and Far East. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2011; 88(5): 12–8. (in Russian)
 - Zadnova S.P., Kul'shan' T.A., Cheldyshova N.B., Kritskiy A.A., Plekhanov N.A., Smirnova N.I. Comparative analysis of survival capacity among typical and genovariant strains of *Vibrio cholerae*, biovar El Tor in vivo and in vitro. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2015; (4): 65–9. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2015-4-65-69> (in Russian)
 - Son M.S., Megli C.J., Kovacicova G., Qadri F., Taylor R.K. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype variant clinical isolates from Bangladesh and Haiti, including a molecular genetic analysis of virulence genes. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49(11): 3739–49. <https://doi.org/10.1128/JCM.01286-11>
 - Satchell K.J.F., Jones C.J., Wong J., Queen J., Agarwal S., Yildiz F.H. Phenotypic analysis reveals that the 2010 Haiti cholera epidemic is linked to a hypervirulent strain. *Infect. Immun.* 2016; 84(9): 2473–81. <https://doi.org/10.1128/IAI.00189-16>
 - Pukatzki S., Ma A.T., Sturtevant D., Krastins B., Sarracino D., Nelson W.C., et al. Identification of a conserved bacterial protease secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2006; 103(5): 1528–33. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510322103>
 - Ma A.T., McAuley S., Pukatzki S., Mekalanos J.J. Translocation of a *Vibrio cholerae* type VI secretion effector requires bacterial endocytosis by host cells. *Cell. Host. Microbe*. 2009; 5(3): 234–43. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.02.005>
 - Joshi A., Kostiuik B., Rogers A., Teschler J., Pukatzki S., Yildiz F.H. Rules of engagement: the type VI secretion system in *Vibrio cholerae*. *Trends. Microbiol.* 2017; 25(4): 267–79. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.12.003>
 - Monakhova E.V., Bozhko N.V. Study of the expression of contact-dependent secretion systems by cholera vibrios on a model *Dictyostelium discoideum*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2010; 87(4): 89–92. (in Russian)
 - Zheng J., Shin O.S., Cameron D.E., Mekalanos J.J. Quorum sensing and a global regulator TsrA control expression of type VI secretion and virulence in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2010; 107(49): 21128–33. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014998107>
 - Miyata S.T., Kitaoka M., Wieteska L., Frech C., Chen N., Pukatzki S. The *Vibrio cholerae* type VI secretion system: evaluating its role in the human disease cholera. *Front. Microbiol.* 2010; 1: 117. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00117>
 - Ishikawa T., Sabharwal D., Bröms J., Milton D.L., Sjöstedt A., Uhlin B.E., et al. Pathoadaptive conditional regulation of the type VI secretion system in *Vibrio cholerae* O1 strains. *Infect. Immun.* 2012; 80(2): 575–84. <https://doi.org/10.1128/IAI.05510-11>
 - Miyata S.T., Unterweger D., Rudko S.P., Pukatzki S. Dual expression profile of type VI secretion system immunity genes protects pandemic *Vibrio cholerae*. *PLoS Pathog.* 2013; 9(12): e1003752. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003752>
 - Unterweger D., Miyata S.T., Bachmann V., Brooks T.M., Mullins T., Kostiuik B., et al. The *Vibrio cholerae* type VI secretion system employs diverse effector modules for intraspecific competition. *Nat. Commun.* 2014; 5: 3549. <https://doi.org/10.1038/ncomms4549>
 - Townsend L., Mangus M.P.S., Mehic S., Yildiz F.H. Response of *Vibrio cholerae* to low temperature shifts: CspV regulation of type VI secretion, biofilm formation, and association with zooplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 2016; 82(14): 4441–52. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00807-16>
 - Crisan C.V., Chande A.T., Williams K., Raghuram V., Rishishwar L., Steinbach G., et al. Analysis of *Vibrio cholerae* genomes identifies new type VI secretion system gene clusters. *Gen. Biol.* 2019; 20(1): 163. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1765-5>
 - Santoriello F.J., Michel L., Unterweger D., Pukatzki S. Pandemic *Vibrio cholerae* shuts down site-specific recombination to retain an interbacterial defence mechanism. *Nat. Commun.* 2020; 11(1): 6246. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20012-7>
 - Kitaoka M., Miyata S.T., Brooks T.M., Unterweger D., Pukatzki S. VasH is a transcriptional regulator of the type VI secretion system functional in endemic and pandemic *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2011; 193(23): 6471–82. <https://doi.org/10.1128/JB.05414-11>
 - Seibt H., Aung K.M., Ishikawa T., Sjöström A., Gullberg M., Atkinson G.C., et al. Elevated levels of VCA0117 (VasH) in response to external signals activate the type VI secretion system of *Vibrio cholerae* O1 El Tor A1552. *Environ. Microbiol.* 2020; 22(10): 4409–23. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15141>
 - Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_t} method. *Methods*. 2001; 25(4): 402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
 - Kritskiy A.A., Cheldyshova N.B., Tuchkov I.V., Smirnova N.I. Development of the algorithm for identification of the level of

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Vibrio cholerae* ctxA and toxR gene expression using RT-PCR with Real-Time hybridization-fluorescent registration of results. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2017; (3): 53–7. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-3-53-57> (in Russian)
27. Smirnova N.I., Agafonova E.Yu., Shchelkanova E.Yu., Agafonov D.A., Krasnov Ya.M., Livanova L.F., et al. Genomic diversity of nontoxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in the territory of Russia and neighboring states. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2018; 36(2): 97–109. <https://doi.org/10.18821/0208-0613-2018-36-2-76-84> (in Russian)
28. Zadnova S.P., Badanin D.V., Plekhanov N.A., Polunina T.A., Kotova N.V., Kritskiy A.A., et al. Comparative proteomic profiles of typical strain and genetically altered variant of *Vibrio cholerae* O1, biovar El Tor. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2020; (3): 150–3. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-3-150-153> (in Russian)
29. Bernardy E.E., Turnsek M.A., Wilson S.K., Tarr C.L., Hammer B.K. Diversity of clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae* in natural transformation and contact-dependent bacterial killing indicative of type VI secretion system activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 2016; 82(9): 2833–42. <https://doi.org/10.1128/AEM.00351-16>

Информация об авторах

Заднова Светлана Петровна[✉] — д.б.н., в.н.с. лаб. патогенных вибрионов Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, svetlanazadnova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4366-0562>

Плеханов Никита Александрович — к.б.н., с.н.с. лаб. патогенных вибрионов Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2355-7018>

Спирина Алина Юрьевна — м.н.с. лаб. патогенных вибрионов Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9779-166X>

Крицкий Андрей Александрович — к.б.н., зав. лаб. патогенных вибрионов Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5506-4285>

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

Статья поступила в редакцию 03.09.2022;
принята к публикации 01.11.2022;
опубликована 30.12.2022

Information about the authors

Svetlana P. Zadnova[✉] — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of pathogenic vibrios, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, svetlanazadnova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4366-0562>

Nikita A. Plekhanov — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of pathogenic vibrios, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2355-7018>

Alina Yu. Spirina — junior researcher, Laboratory of pathogenic vibrios, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9779-166X>

Andrey A. Kritskiy — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of pathogenic vibrios, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5506-4285>

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

The article was submitted 03.09.2022;
accepted for publication 01.11.2022;
published 30.12.2022

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-298>

Детерминанты вирулентности и генотипы клинических изолятов *Helicobacter pylori*

Сварваль А.В., Старкова Д.А.[✉], Ферман Р.С.

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

Аннотация

Введение. *Helicobacter pylori* — основной возбудитель гастродуоденальных заболеваний человека, развитие и степень тяжести которых зависят от вирулентности штаммов *H. pylori*.

Цель — выявление детерминант вирулентности и сравнительный анализ генотипов *H. pylori* у пациентов с хроническим гастритом (ХГ) и язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки (ЯБДК).

Материалы и методы. Изучены 53 штамма *H. pylori*, выделенные в Санкт-Петербурге от пациентов с *H. pylori*-ассоциированными заболеваниями: 34 — с ХГ, 19 — с ЯБДК. Стандартным методом ПЦР определены генетические детерминанты вирулентности *cagA*, *iceA*, *vacA* и генотипы *H. pylori* у пациентов с ХГ и ЯБДК.

Результаты. Ген *cagA* обнаружен у 64,1% штаммов *H. pylori*. У пациентов с ХГ и ЯБДК доля *cagA*+ штаммов *H. pylori* составляла 55,8 и 78,9 соответственно ($p > 0,05$). Аллельный вариант *iceA1* *H. pylori* выявлен у 47,4% пациентов с ЯБДК, *iceA2* — у 47,1% пациентов с ХГ ($p > 0,05$); аллель *vacAs1* доминировал у штаммов, выделенных от больных ЯБДК (94,7% против 70,6% при ХГ; $p < 0,05$). Существенной разницы в распределении аллельных вариантов *m1* и *m2* гена *vacA* *H. pylori* между группами пациентов не выявлено. Доля штаммов *H. pylori* генотипа *s1/m2* у пациентов с ЯБДК (52,6%) значительно превышала таковую у пациентов с ХГ (20,6%); $p = 0,02$. Все *cagA*+ штаммы являлись носителями аллеля *vacAs1*. Подавляющее большинство штаммов (10 из 11) генотипа *cagA*-/*vacAs2* выделены от больных ХГ.

Заключение. Установлена статистически значимая ассоциация аллельных вариантов *vacAs1* и *vacAs2*, а также генотипов *vacA s1/m2* и *vacA s2/m2* возбудителя с тяжестью клинических проявлений инфекции *H. pylori*. Генотипы *vacAs1* и *vacA s1/m2* возбудителя ассоциированы с язвой двенадцатиперстной кишки.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, *cagA*, *iceA*, *vacA*, генотипирование, гены вирулентности, хронический гастрит, язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом СПбНИИЭМ им. Пастера (протокол № 50/04-2019 от 22.06.2020).

Благодарность. Авторы выражают благодарность д.м.н., профессору Ольге Викторовне Нарвской за ценные замечания и оказанную помощь при написании статьи.

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: Сварваль А.В., Старкова Д.А., Ферман Р.С. Детерминанты вирулентности и генотипы клинических изолятов *Helicobacter pylori*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2022;99(6):692–700.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-298>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-298>

Virulence determinants and genotypes of *Helicobacter pylori* clinical isolates

Alena V. Svarval, Daria A. Starkova[✉], Raisa S. Ferman

St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia

Abstract

Background. *H. pylori* is the principal causative agent of gastroduodenal disorders in humans. The development and severity of lesions in infected individuals depend on the virulence of *H. pylori* strains.

Aims: Detection of virulence determinants and comparative analysis of *H. pylori* genotypes in patients with chronic gastritis (CG) and duodenal ulcer (DU).

Materials and methods. The 53 *H. pylori* strains were isolated in St. Petersburg from patients with CG ($n = 34$) and DU ($n = 19$). The genetic determinants of virulence *cagA*, *iceA*, *vacA* and *H. pylori* genotypes in patients with CG and UC were determined using the standard PCR method.

Results. The *cagA* gene was found in 64.1% of *H. pylori* strains. The proportions of *cagA*⁺ isolates from patients with CG and DU was 55.8% (15/34) and 78.9% (15/19), respectively ($p > 0.05$). The *iceA1* allele of *H. pylori* was detected in 47.4% of patients with DU, the *iceA2* — in 47.1% of patients with CG ($p > 0.05$). The *vacAs1* allele was significantly dominant in patients with DU — 94.7% versus 70.6% in CG ($p < 0.05$). No significant difference in *vacA* m1 and m2 alleles was found in *H. pylori* from different groups of patients ($p > 0.05$). All *cagA*⁺ strains were carriers of the *vacA* s1 allele. The vast majority of strains (10 out of 11) of the *cagA*⁻/*vacAs2* genotype were isolated from patients with CG.

Conclusion. The significant association between *vacAs1*, *vacAs2* allelic variants, as well as *vacA* s1/m2, *vacA* s2/m2 genotypes of the pathogen and severity of clinical manifestations of *H. pylori* infection has been established in our study. The *vacAs1* and *vacA* s1/m2 genotypes of the pathogen are associated with duodenal ulcer.

Keywords: *Helicobacter pylori*, *cagA*, *iceA*, *vacA*, virulence determinant, genotyping, chronic gastritis, duodenal ulcer

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the St. Petersburg Pasteur Institute (protocol No. 50/04-2019, June 22, 2020).

Acknowledgement. Authors thank Dr. Olga Narvskaya for help with writing assistance, technical editing and proofreading.

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: Svarval A.V., Starkova D.A., Ferman R.S. Virulence determinants and genotypes of *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(6):692–700.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-298>

Введение

Helicobacter pylori — микроаэрофильные грамотрицательные бактерии спиралевидной формы, которые являются основными возбудителями гастродуоденальных заболеваний человека (хронический гастрит, пептическая язва, аденокарцинома, лимфома желудка). Развитие и степень тяжести поражений у инфицированных лиц зависят от вирулентности штаммов *H. pylori*, факторов окружающей среды и восприимчивости организма-хозяина [1].

Многочисленные факторы вирулентности обеспечивают адаптацию *H. pylori* к агрессивным условиям среды обитания, способствуя выживанию и размножению в организме хозяина. Описаны гены, ассоциированные с вирулентностью *H. pylori*, которые играют ключевую роль в развитии инфекционного процесса [1, 2].

Основной детерминантой вирулентности *H. pylori* является остров патогенности *cagPAI* (*Cytotoxin-associated Antigen Pathogenesis Island*) — протяжённый участок генома (40 kb), включающий семейство генов *cag* (более 30). Гены *cagPAI* кодируют белки системы секреции IV типа, которые обеспечивают транспорт иммуногенного белка *CagA* в эпителиоциты слизистой оболочки желудка, где он подвергается фосфорилированию протеинкиназами. Это приводит к морфологическим изменениям

эпителиальных клеток, стимулируя развитие таких патологических процессов, как язвообразование и рак желудка [2]. Ген *cagA* является маркером присутствия *cagPAI* и обнаружен в геноме 25–99% штаммов *H. pylori* в зависимости от их географического происхождения [3].

Полагают, что ген *iceA* (*Induced by Contact with Epithelium*) также может служить «маркером» патогенности *H. pylori*. Ген *iceA* имеет 2 аллельных варианта: *iceA1* и *iceA2*. Экспрессия гена *iceA* активируется при контакте *H. pylori* с эпителиоцитами человека. По данным ряда авторов, генотип *iceA1* стимулирует адгезию к эпителиальным клеткам желудка и связан с повышенным уровнем индукции интерлейкина-8, стимулируя развитие язвенной болезни двенадцатиперстной кишки (ЯБДК) [4].

Ген *vacA* (*Vacuolating-Associated Cytotoxin*) присутствует в геноме всех штаммов *H. pylori* и кодирует цитотоксин (~140 кД), индуцирующий вакуолизацию эпителиальных клеток желудка, что в конечном счёте приводит к их апоптозу [5]. Установлено, что цитотоксичность белка связана с мозаичностью структуры гена *vacA* (s-, m-, i-регионы) [6]. Рядом зарубежных авторов выявлена зависимость между генотипом и вирулентностью возбудителя: штаммы *H. pylori* генотипа s1/m1 обладают наибольшей цитотоксической активностью белка — продукта *vacA* — по сравнению со штам-

мами генотипа s2/m2, а коэкспрессия генов *cagA* и *vacA* генотипа s1/m1 способствует прогрессированию язвенной болезни и карциномы желудка [7]. В российской литературе имеется ограниченное число публикаций, посвящённых изучению генетического разнообразия *H. pylori* в России.

Целью настоящего исследования являлось выявление детерминант вирулентности и сравнительный анализ генотипов *H. pylori* у пациентов с хроническим гастритом (ХГ) и ЯБДК.

Материалы и методы

Изучены 53 штамма *H. pylori*, выделенные от 34 взрослых пациентов с ХГ и 19 пациентов с ЯБДК за 2014–2019 гг. в Санкт-Петербургском научно-исследовательском институте эпидемиологии и микробиологии им. Пастера. Исследуемая группа включала 28 (52,8%) женщин и 25 (47,2%) мужчин в возрасте 17–88 лет (средний возраст 44 года). Исследование одобрено независимым локальным этическим комитетом СПбНИИЭМ им. Пастера (протокол № 50/04-2019 от 22.06.2020).

Бактериологическому исследованию подлежали биоптаты слизистой оболочки антрального отдела желудка, которые были взяты во время эндоскопии в асептических условиях. Биопсийный материал помещали в пробирку типа «эппендорф» с тиоглектолевой средой для контроля стерильности. Культивирование *H. pylori* осуществляли на селективной среде на основе Колумбийского агара (с добавлением 5–7% дефибрированной лошадиной крови и 1% раствора IsoVitalex) при 37°C. Посевы инкубировали в микроаэрофильных условиях (содержание кислорода ~5%) с использованием анаэроостатов системы «GasPak 100». Для создания микроаэробной атмосферы использовали газогенерирующие пакеты. Видимый рост культур бактерий наблюдали в течение 5–7 дней. Для пер-

вичной идентификации мазки культур окрашивали по Граму. Видовую идентификацию клинических изолятов проводили с использованием биохимических тестов (уреазный, каталазный, оксидазный). При положительном результате 3 тестов культуру идентифицировали как *H. pylori*.

Хромосомную ДНК из чистых культур *H. pylori* выделяли с помощью набора «Хеликопол II» (НПФ «Литех») и использовали для постановки ПЦР с целью детекции гена *cagA* и типирования генов *vacA* и *iceA*. Амплификацию осуществляли в термоциклере «Bio-Rad C1000 Thermal Cycler» («Bio-Rad»). Нуклеотидные последовательности праймеров, температура отжига и характеристика продуктов амплификации приведены в **табл. 1**. Условия проведения ПЦР: 95°C — 3 мин; 35 циклов: 94°C — 35 с, температура отжига — 35 с, 72°C — 45 с; 72°C — 5 мин. Продукты ПЦР разделяли в 2% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Длину продуктов амплификации определяли с использованием маркеров молекулярной массы 50 bp и 100 bp DNA Ladder (ООО «Интерлабсервис»). Результаты визуализировали с помощью системы документации гелей «GelDoc» («BioRad»).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием пакета программ «SPSS Statistics v. 12» («StatSoft Inc.») и ресурса «Медицинская статистика»¹, вычисляя значения критерия χ^2 Пирсона и отношения шансов (ОШ) с помощью четырехпольных таблиц. Различия между группами считали статистически значимыми при 95% доверительном интервале (ДИ) и $p < 0,05$.

Результаты

В результате культивирования образцов исследуемого материала на селективной среде в течение 7 дней при 37°C в микроаэрофильных условиях был получен видимый рост гладких, круглых, прозрач-

Таблица 1. Праймеры, используемые для ПЦР-детекции гена *cagA* и типирования генов *iceA* и *vacA*

Table 1. Oligonucleotide primers used in PCR detection of *cagA* gene and typing *iceA* и *vacA* genes

Гены Genes	Наименование праймеров Primer designation	Последовательности праймеров Primer sequence	Температура отжига праймеров, °C Annealing temperature, °C	Длина ПЦР продукта, п.н. Size and location of PCR product, bp	Ссылка Reference
<i>iceA1</i>	iceA1F iceA1R	GTGTTTTTAACCAAAGTATC CTATAGCCACTYTCCTTGCA	43	247	[10]
<i>iceA2</i>	iceA2F iceA2R	GTTGGGTATATCACAATTTAT TTRCCCTATTTTCTAGTAGGT	45	229/334	[10]
<i>cagA</i>	CagA_F CagA_R	GATAACAGGCAAGCTTTTGAGG CTGCAAAAGATTGTTTGCCAGA	56	349	[8]
<i>vacA s1/s2</i>	VAI-F VAI-R	ATGGAAATACAACAACACAC CTGCTTGAATGCGCCAAAC	53	259/286	[6]
<i>vacA m1/m2</i>	VAG-F VAG-R	CAATCTGTCCAATCAAGCGAG GCGTCAAAATAATCCAAGG	52	570/645	[9]

ных колоний бактерий. При окраске по Граму обнаружены граммотрицательные палочки изогнутой формы. Положительные результаты биохимических тестов (каталаза/уреаза/цитохромоксидаза) позволили отнести 53 культуры бактерий к виду *H. pylori*.

Исследование образцов ДНК выявило неоднородность штаммов *H. pylori* данной выборки. Присутствие гена *cagA*, а также распределение аллельных вариантов генов *iceA* и *vacA* у клинических изолятов *H. pylori*, полученных от двух групп больных, представлено в **табл. 2**. Ген *cagA* был обнаружен у 64,1% (34 из 53) клинических изолятов. Анализ распределения *cagA*-позитивных штаммов *H. pylori* не выявил статистически значимых различий между группами пациентов с ХГ и ЯБДК (ОШ 2,96 [0,81–10,80]; $p > 0,05$).

Гены *iceA* и *vacA* в различных аллельных вариантах выявлены у всех штаммов *H. pylori* (табл. 2). Доли аллельных вариантов *iceA1* и *iceA2* штаммов *H. pylori* различались у пациентов с ХГ и ЯБДК: аллельный вариант *iceA1* штаммов *H. pylori* преобладал у пациентов с ЯБДК (47,4%), тогда как *iceA2* — у пациентов с ХГ (47,1%). Однако данное различие было статистически не значимо ($p > 0,05$). В 9 (17%) случаях обнаружены смешанные варианты гена *iceA* штаммов возбудителя, которые характеризовались присутствием как *A1*, так и *A2* аллелей.

Среди аллелей гена *vacA* штаммов *H. pylori* доминировал *s1* (79,2%). Как видно из табл. 2, доли аллеля *vacAs1* существенно различались у штаммов, выделенных от больных ХГ и ЯБДК: 70,6 и 94,7% соответственно (критерий χ^2 4,32 превышал критическое значение 3,84; уровень значимости данной связи $p < 0,05$). Напротив, аллель *vacAs2* *H. pylori* преобладал в группе больных ХГ ($p = 0,04$). Существенной разницы в распределении вариантов

m1 и *m2* гена *vacA* *H. pylori* между группами пациентов не выявлено ($p = 0,58$).

Аллельные варианты *s* и *m* гена *vacA* группировались в три генотипа: *s1/m1*, *s1/m2* и *s2/m2*. Редкий генотип *vacA s2/m1* в нашем исследовании не обнаружен. Все штаммы аллеля *vacAs2* являлись носителями аллеля *m2* в обеих группах пациентов, однако статистически значимо были ассоциированы с ХГ ($p = 0,04$; табл. 2). Доля штаммов *H. pylori* генотипа *s1/m2* у пациентов с ЯБДК (52,6%) значимо превышала таковую у пациентов с ХГ (20,6%); $p = 0,02$. Наблюдаемая зависимость являлась статистически значимой (ОШ = 4,29 [1,26–14,60]; $p < 0,05$).

Анализ сочетаний генов *vacA*, *cagA* и *iceA* позволил выявить взаимосвязь между статусом *cagA+* и аллельным вариантом *s1* гена *vacA* у клинических изолятов *H. pylori*: все *cagA*-позитивные штаммы являлись носителями аллеля *vacAs1*, тогда как ни один штамм аллеля *s2* *cagA*-позитивным не был (табл. 3). При этом доля штаммов генотипа *cagA+/vacAs1* *H. pylori* у больных ЯБДК составляла 78,9% (15 из 19) против 55,9% (19 из 34) у больных ХГ ($p = 0,09$). Подавляющее большинство штаммов (10 из 11) генотипа *cagA-/vacAs2* выделены от больных ХГ.

Ассоциации генотипов *iceA1* и *iceA2* с присутствием гена *cagA* и/или аллельными вариантами гена *vacA* не выявлено (табл. 3).

Суммарные результаты генотипирования по трем детерминантам вирулентности *cagA*, *iceA* и *vacA* в настоящем исследовании позволили выявить 14 вариантов профилей (комбинированных генотипов) у 53 штаммов *H. pylori* (табл. 4). Среди вариантов преобладали генотипы *cagA+/iceA2/vacAs1/m1* и *cagA+/iceA1/vacAs1/m1*, которые объединяли 9 (17%) и 8 (15%) штаммов соответственно. Осталь-

Таблица 2. Генотипы штаммов *H. pylori* при различных формах инфекции
Table 2. *H. pylori* genotypes distribution in patients with different forms of infection

Гены и генотипы Genes and genotypes	ХГ, <i>n</i> (%) CG, <i>n</i> (%) (<i>n</i> = 34)	ЯБДК, <i>n</i> (%) DU, <i>n</i> (%) (<i>n</i> = 19)	χ^2	<i>p</i>	ОШ OR	95% ДИ 95% CI
<i>cagA</i> +	19 (55,8)	15 (78,9)	2,82	0,09	2,96	0,81–10,80
<i>iceA1</i>	12 (35,3)	9 (47,4)	0,74	0,39	1,65	0,52–5,17
<i>iceA2</i>	16 (47,1)	7 (36,8)	0,52	0,47	0,66	0,21–2,07
<i>iceA1A2</i>	6 (17,6)	3 (15,8)	0,04*	0,83	0,87	0,19–3,99
<i>vacAs1</i>	24 (70,6)	18 (94,7)	4,32	0,04	7,50	0,88–64,04
<i>vacAs2</i>	10 (29,4)	1 (5,3)	4,32	0,04	0,13	0,02–1,14
<i>vacAm1</i>	17 (50,0)	8 (42,1)	0,30	0,58	0,73	0,23–2,26
<i>vacAm2</i>	17 (50,0)	11 (57,9)	0,30	0,58	1,38	0,44–4,27
<i>vacA s1/m1</i>	17 (50,0)	8 (42,1)	0,30	0,58	0,73	0,23–2,26
<i>vacA s1/m2</i>	7 (20,6)	10 (52,6)	5,74	0,02	4,29	1,26–14,60
<i>vacA s2/m2</i>	10 (29,4)	1 (5,3)	4,32	0,04	0,13	0,02–1,14

Примечание. *С учётом поправки Йейтса.
Note. *With the Yates's correction.

Таблица 3. Аллельные варианты генов *vacA* и *iceA* у *cagA*+ и *cagA*- штаммов *H. pylori*, *n***Table 3.** Allelic variants of the *vacA* and *iceA* genes in *cagA*+ and *cagA*- *H. pylori* strains, *n*

Генотипы Genotypes	<i>cagA</i> + (<i>n</i> = 34)	<i>cagA</i> - (<i>n</i> = 19)
<i>vacAs1</i>	34	8
<i>vacAs2</i>	–	11
<i>vacAm1</i>	20	5
<i>vacAm2</i>	14	14
<i>vacA s1/m1</i>	20	5
<i>vacA s1/m2</i>	14	3
<i>vacA s2/m2</i>	–	11
<i>iceA1</i>	14	7
<i>iceA2</i>	14	9
<i>ice A1A2</i>	6	3

ные генотипы были представлены группами от 1 до 6 штаммов. Таким образом, явно доминирующего комбинированного генотипа в нашем исследовании не выявлено.

Обсуждение

Ген *cagA*, являясь наиболее информативной детерминантой вирулентности, широко используется для генотипирования *H. pylori*. Гетерогенность клинических изолятов *H. pylori* в разных странах обусловлена этническими, социоэкономическими и экологическими особенностями. Так, многочисленные исследования, проведённые в странах Европы и США, показали, что *CagA*-продуцирующие штаммы *H. pylori* более вирулентны, нежели

CagA-негативные, и вызывают тяжёлые поражения желудочно-кишечного тракта человека: от больных с пептической язвой и раком желудка *cagA*-позитивные штаммы выделяли в 80–100% случаев [11, 12]. Известно, что практически все штаммы восточноазиатской популяции являются носителями гена *cagA* независимо от степени тяжести инфекционного процесса [13, 14].

В российской литературе имеется ограниченное число публикаций, посвящённых генетическому разнообразию *H. pylori*, причём сведения о роли различных генотипов в развитии гастродуоденальной патологии противоречивы. Согласно результатам исследований, проведённых в Москве [15], ген *cagA* был обнаружен у 100% клинических изолятов *H. pylori*, тогда как в Ярославле — территориально близком городе — доля *cagA*+ штаммов составляла лишь 43% [16]. В городах южного региона — Астрахани и Ростове — *cagA*+ штаммы выявлены в 71 и 81% случаев соответственно [17, 18]. В нашем исследовании ген вирулентности *cagA* был обнаружен у 64,1% клинических изолятов. Несмотря на преобладание штаммов *cagA*+ у больных ЯБДК (78,9% против 55,8% с ХГ), статистически значимых различий между группами пациентов не выявлено. Полученные результаты указывают на роль белка *CagA* как фактора вирулентности возбудителя, однако вместе с тем свидетельствуют о необходимости проведения масштабной оценки перспективности гена *cagA* в качестве генетического маркера тяжести поражений при инфекции *H. pylori*.

Роль гена *iceA* *H. pylori* в развитии гастродуоденальной инфекции до сих пор не определена, а данные, полученные в разных странах, противопо-

Таблица 4. Комбинированные генотипы штаммов *H. pylori* при различных формах инфекции, *n* (%)**Table 4.** Combined genotypes of *H. pylori* strains in different forms of infection, *n* (%)

Комбинированные генотипы <i>H. pylori</i> Combined genotypes	ХГ CG (<i>n</i> = 34)	ЯБДК DU (<i>n</i> = 19)	Всего Total (<i>n</i> = 53)
<i>cagA</i> - <i>iceA1</i> / <i>vacA s1/m1</i>	1 (2,9)	–	1 (1,9)
<i>cagA</i> - <i>iceA1</i> / <i>vacA s1/m2</i>	–	1 (5,3)	1 (1,9)
<i>cagA</i> - <i>iceA1</i> / <i>vacA s2/m2</i>	4 (11,8)	1 (5,3)	5 (9,4)
<i>cagA</i> - <i>iceA1A2</i> / <i>vacA s1/m1</i>	2 (5,9)	–	2 (3,8)
<i>cagA</i> - <i>iceA1A2</i> / <i>vacA s2/m2</i>	1 (2,9)	–	1 (1,9)
<i>cagA</i> - <i>iceA2</i> / <i>vacA s1/m1</i>	1 (2,9)	1 (5,3)	2 (3,8)
<i>cagA</i> - <i>iceA2</i> / <i>vacA s1/m2</i>	1 (2,9)	1 (5,3)	2 (3,8)
<i>cagA</i> - <i>iceA2</i> / <i>vacA s2/m2</i>	5 (14,7)	–	5 (9,4)
<i>cagA</i> + <i>iceA1</i> / <i>vacA s1/m1</i>	5 (14,7)	3 (15,8)	8 (15,1)
<i>cagA</i> + <i>iceA1</i> / <i>vacA s1/m2</i>	2 (5,9)	4 (21,1)	6 (11,3)
<i>cagA</i> + <i>iceA1A2</i> / <i>vacA s1/m1</i>	3 (8,8)	–	3 (5,7)
<i>cagA</i> + <i>iceA1A2</i> / <i>vacA s1/m2</i>	–	3 (15,8)	3 (5,7)
<i>cagA</i> + <i>iceA2</i> / <i>vacA s1/m1</i>	5 (14,7)	4 (21,1)	9 (16,9)
<i>cagA</i> + <i>iceA2</i> / <i>vacA s1/m2</i>	4 (11,8)	1 (5,3)	5 (9,4)

речивы. Принято считать, что генотип *iceA1* является «маркером» язвенного поражения гастродуоденальной системы. Исследования, проведённые в Нидерландах [10], Египте [19] и Китае [20], демонстрируют связь генотипа *iceA1* *H. pylori* не только с язвенной болезнью, но и раком желудка. Однако в ряде других исследований (США, Колумбия, Япония, Корея, Болгария, Таиланд, Португалия) сообщается об отсутствии ассоциации *iceA1* с тяжестью клинических проявлений инфекции *H. pylori* [9, 12, 13, 20, 22]. В разных регионах России выявляют в среднем от 46% (Москва) до 60% (Казань, Ростов-на-Дону) штаммов *H. pylori* генотипа *iceA1* [15, 17, 23]. Ряд авторов указывают на характерный для российских регионов высокий уровень встречаемости смешанных генотипов *iceA1A2* (20–40%), что может свидетельствовать о присутствии в организме человека нескольких штаммов микроорганизма. Более того, К. Момуналиев и соавт. сообщают об отсутствии выявляемости генотипа *iceA2* у клинических изолятов *H. pylori* (только в составе смешанного генотипа *iceA1A2*) [24].

Несмотря на то что в нашем исследовании генотип *iceA1* штаммов *H. pylori* преобладал у пациентов с ЯБДК (47,4%), а генотип *iceA2* — у пациентов с ХГ (47,1%), статистически значимой разницы между группами не выявлено. Возможно, одной из причин являлось наличие смешанных вариантов *iceA1A2* (17%), которые могут скрывать потенциальную связь между генотипами *iceA* возбудителя и клиническими проявлениями инфекции *H. pylori*. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о нецелесообразности использования аллелей гена *iceA* в качестве генетических маркеров тяжести инфекции *H. pylori*.

Разнообразие аллельных вариантов s- и m-областей гена *vacA* обуславливает разную степень цитотоксической активности кодируемого ими белка, которая определяет тяжесть поражений при инфекции *H. pylori* [5, 6].

В нашем исследовании среди аллелей гена *vacA* штаммов *H. pylori* доминировал s1 (79,2%), что согласуется с результатами исследований, проведённых в Москве, Ростове-на-Дону, Казани [15, 17, 23]. Нами также установлено, что штаммы *H. pylori* генотипа *vacAs1* статистически значимо ассоциированы с ЯБДК (лишь 1 из 19 штаммов относился к альтернативному аллелю *vacAs2*). Таким образом, тяжесть поражения зависела от присутствия аллеля *vacAs1*.

Вопреки распространённому мнению о роли генотипа *vacA* s1/m1 *H. pylori* в развитии язвенной болезни, в нашем исследовании значимых различий в распределении штаммов данного генотипа возбудителя между группами пациентов не выявлено. Напротив, доля штаммов *H. pylori* генотипа s1/m2 у пациентов с ЯБДК значимо пре-

вышала таковую у пациентов с ХГ ($p = 0,02$). Таким образом, штаммы *H. pylori* генотипа s1/m2 достоверно чаще встречаются в группе ЯБДК. Полученные данные согласуются с исследованиями в Китае [20], Иране [25], Тунисе [26], Бразилии [27], Тайване [28] и Турции [29]. Генотип *vacA* s2/m2 *H. pylori* встречался преимущественно у больных ХГ ($p = 0,04$), что не противоречит общепринятому мнению об отсутствии цитотоксической активности штаммов *H. pylori* генотипа s2/m2.

Анализ комбинированных генов *vacA*, *cagA* и *iceA* позволил выявить взаимосвязь между статусом *cagA+* и аллельным вариантом s1 гена *vacA*. Кроме того, доля штаммов генотипа *cagA+/vacAs1* *H. pylori* у больных ЯБДК составляла 78,9%, тогда как подавляющее большинство штаммов (90,9%) генотипа *cagA-/vacAs2* были выделены от больных ХГ. Полученные данные согласуются с представлением об ассоциации генотипа *cagA+/vacAs1* штаммов с риском развития язвенной болезни, тогда как штаммы *cagA-/vacAs2* считаются менее вирулентными и редко связаны с прогрессирующим течением инфекции *H. pylori* [10, 11, 22, 30].

Заключение

Анализ генетического полиморфизма клинических штаммов *H. pylori* выявил неоднородность популяции возбудителя хеликобактериоза в Санкт-Петербурге. Показано, что частота встречаемости генов *cagA*, *iceA* и *vacA*, а также их комбинированных генотипов различается у штаммов *H. pylori*, выделенных от больных ХГ и ЯБДК. Установлена статистически значимая ассоциация аллельных вариантов *vacAs1* и *vacAs2*, а также генотипов *vacA* s1/m2 и *vacA* s2/m2 возбудителя с клиническими проявлениями инфекции *H. pylori*. Генотипы *vacAs1* и *vacA* s1/m2 возбудителя ассоциированы с ЯБДК. Полученные результаты вносят существенный вклад в характеристику глобальной популяции данного возбудителя, а также свидетельствуют о необходимости поиска надёжных генетических маркеров клинических проявлений инфекции *H. pylori*.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. de Brito B.B., da Silva F.A.F., Soares A.S., Pereira V.A., Santos M.L.C., Sampaio M.M., et al. Pathogenesis and clinical management of *Helicobacter pylori* gastric infection. *World J. Gastroenterol.* 2019; 25(37): 5578–89. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i37.5578>
2. Nejati S., Karkhah A., Darvish H., Validi M., Ebrahimpour S., Nouri H.R. Influence of *Helicobacter pylori* virulence factors CagA and VacA on pathogenesis of gastrointestinal disorders. *Microb. Pathog.* 2018; 117: 43–8. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.016>
3. Covacci A., Telford J.L., Del Giudice G., Parsonnet J., Rappuoli R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science.* 1999; 284(5418): 1328–33. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1328>

4. Whitmire J.M., Merrell D.S. *Helicobacter pylori* genetic polymorphisms in gastric disease development. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019; 1149: 173–94. https://doi.org/10.1007/5584_2019_365
5. Foegeding N.J., Caston R.R., McClain M.S., Ohi M.D., Cover T.L. An overview of *Helicobacter pylori* VacA toxin biology. *Toxins (Basel)*. 2016; 8(6): E173. <https://doi.org/10.3390/toxins8060173>
6. Atherton J.C., Cao P., Peek R.M.Jr., Tummuru M.K., Blaser M.J., Cover T.L. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J. Biol. Chem.* 1995; 270(30): 17771–7. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.30.17771>
7. Van Doorn L.J., Figueiredo C., Mégraud F., Pena S., Midolo P., Queiroz D.M., et al. Geographic distribution of vacA allelic types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol.* 1999; 116(4): 823–30. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(99\)70065-x](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(99)70065-x)
8. Tummuru M.K., Cover T.L., Blaser M.J. Cloning and expression of a high-molecular mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect. Immun.* 1993; 61(5): 1799–809. <https://doi.org/10.1128/iai.61.5.1799-1809.1993>
9. Yamaoka Y., Kodama T., Gutierrez O., Kim J.G., Kashima K., Graham D.Y. Relationship between *Helicobacter pylori* iceA, cagA, and vacA status and clinical outcome: studies in four different countries. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37(7): 2274–9. <https://doi.org/10.1128/jcm.37.7.2274-2279.1999>
10. van Doorn L.J., Figueiredo C., Sanna R., Plaisier A., Schneeberger P., de Boer W., et al. Clinical relevance of the cagA, vacA, and iceA status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol.* 1998; 115(1): 58–66. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(98\)70365-8](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(98)70365-8)
11. Miehlke S., Kirsch C., Agha-Amiri K., Günther T., Lehn N., Malfertheiner P., et al. The *Helicobacter pylori* vacA s1, m1 genotype and cagA is associated with gastric carcinoma in Germany. *Int. J. Cancer.* 2000; 87(3): 322–7.
12. Podzorski R.P., Podzorski D.S., Wuerth A., Tolia V. Analysis of the vacA, cagA, cagE, iceA, and babA2 genes in *Helicobacter pylori* from sixty-one pediatric patients from the Midwestern United States. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2003; 46(2): 83–8. [https://doi.org/10.1016/s0732-8893\(03\)00034-8](https://doi.org/10.1016/s0732-8893(03)00034-8)
13. Perng C.L., Lin H.J., Sun I.C., Tseng G.Y. *Helicobacter pylori* cagA, iceA and vacA status in Taiwanese patients with peptic ulcer and gastritis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2003; 18(11): 1244–9. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1746.2003.03214.x>
14. Uchida T., Miftahussurur M., Pittayanon R., Vilaichone R.K., Wisedopas N., Ratanachu-Ek T., et al. *Helicobacter pylori* infection in thailand: a nationwide study of the CagA phenotype. *PLoS One.* 2015; 10(9): e0136775. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136775>
15. Говорун В.М., Момыналиев К.Т., Смирнова О.В., Чельшева В.В., Кудрявцева Л.В., Сергиенко В.И. и др. Современные подходы к молекулярной диагностике и типированию клинических изолятов *Helicobacter pylori* в России. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.* 2002; 12(3): 57–65.
16. Спивак Е.М., Левит Р.М., Кузьмина Г.В., Деменчук М.Ю. Влияние генетической характеристики *Helicobacter pylori* на воспалительный процесс в слизистой оболочке верхних отделов пищеварительного тракта детей с хроническим гастритом. *Бактериология.* 2017; 2(4): 25–9. <https://doi.org/10.20953/2500-1027-2017-4-25-29>
17. Березняк Е.А., Сорокин В.М., Карпова И.О., Ступина Н.А., Терентьев А.Н. Особенности генотипов штаммов *Helicobacter pylori*, циркулирующих в Ростовской области. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2013; (4): 30–3.
18. Сорокин В.М., Писанов Р.В., Водопоьянов А.С., Голубкина Е.В., Березняк Е.А. Сравнительный анализ генотипов штаммов *Helicobacter pylori* в Ростовской и Астраханской области. *Медицинский вестник Юга России.* 2018; 9(4):81–6. <https://doi.org/10.21886/2219-8075-2018-9-4-81-86>
19. Abu-Taleb A.M.F., Abdelattef R.S., Abdel-Hady A.A., Omran F.H., El-Korashi L.A., Abdel-Aziz El-Hady H., et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* cagA and iceA genes and their association with gastrointestinal diseases. *Int. J. Microbiol.* 2018; 2018: 4809093. <https://doi.org/10.1155/2018/4809093>
20. Wei G.C., Chen J., Liu A.Y., Zhang M., Liu X.J., Liu D., et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA and iceA genotypes and correlation with clinical outcome. *Exp. Ther. Med.* 2012; 4(6): 1039–44. <https://doi.org/10.3892/etm.2012>
21. Boyanova L., Yordanov D., Gergova G., Markovska R., Mitov I. Association of iceA and babA genotypes in *Helicobacter pylori* strains with patient and strain characteristics. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2010; 98(3): 343–50. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9448-y>
22. Almeida N., Donato M.M., Romãozinho J.M., Luxo C., Cardoso O., Cipriano M.A., et al. Correlation of *Helicobacter pylori* genotypes with gastric histopathology in the central region of a South-European country. *Dig. Dis. Sci.* 2015; 60(1): 74–85. <https://doi.org/10.1007/s10620-014-3319-8>
23. Ахтереева А.Р., Давидюк Ю.Н., Файзуллина Р.А., Ивановская К.А., Сафин А.Г., Сафина Д.Д. и др. Распространённость генотипов *Helicobacter pylori* у пациентов с гастродуоденальной патологией в Казани. *Казанский медицинский журнал.* 2017; (5): 723–8. <https://doi.org/10.17750/KMJ2017-723>
24. Momynaliev K., Smirnova O., Kudryavtseva L., Govorun V. *Helicobacter pylori* genotypes in Russia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2003; 22(9): 573–4. <https://doi.org/10.1007/s10096-003-0987-2>
25. Keikha M., Ali-Hassanzadeh M., Karbalaee M. Association of *Helicobacter pylori* vacA genotypes and peptic ulcer in Iranian population: a systematic review and meta-analysis. *BMC Gastroenterol.* 2020; 20(1): 266. <https://doi.org/10.1186/s12876-020-01406-9>
26. Ben Mansour K., Fendri C., Zribi M., Masmoudi A., Labbene M., Fillali A., et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA, iceA and oipA genotypes in Tunisian patients. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2010; 9: 10. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-9-10>
27. Ribeiro M.L., Godoy A.P., Benvenço Y.H., Mendonça S., Pedrazzoli J. Jr. Clinical relevance of the cagA, vacA and iceA genotypes of *Helicobacter pylori* in Brazilian clinical isolates. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2003; 36(3): 181–5. [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(03\)00029-4](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(03)00029-4)
28. Lin H.J., Perng C.L., Lo W.C., Wu C.W., Tseng G.Y., Li A.F., et al. *Helicobacter pylori* cagA, iceA and vacA genotypes in patients with gastric cancer in Taiwan. *World J. Gastroenterol.* 2004; 10(17): 2493–7. <https://doi.org/10.3748/wjg.v10.i17.2493>
29. Erzincan Y., Koksall V., Altun S., Dobrucali A., Aslan M., Erdamar S., et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA, cagE, iceA, babA2 genotypes and correlation with clinical outcome in Turkish patients with dyspepsia. *Helicobacter.* 2006; 11(6): 574–80. <https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2006.00461.x>
30. Marie M.A. Relationship between *Helicobacter pylori* virulence genes and clinical outcomes in Saudi patients. *J. Korean Med. Sci.* 2012; 27(2): 190–3. <https://doi.org/10.3346/jkms.2012.27.2.190>

REFERENCES

1. de Brito B.B., da Silva F.A.F., Soares A.S., Pereira V.A., Santos M.L.C., Sampaio M.M., et al. Pathogenesis and clinical management of *Helicobacter pylori* gastric infection. *World J. Gastroenterol.* 2019; 25(37): 5578–89. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i37.5578>

2. Nejati S., Karkhah A., Darvish H., Validi M., Ebrahimpour S., Nouri H.R. Influence of *Helicobacter pylori* virulence factors CagA and VacA on pathogenesis of gastrointestinal disorders. *Microb. Pathog.* 2018; 117: 43–8. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.016>
3. Covacci A., Telford J.L., Del Giudice G., Parsonnet J., Rappuoli R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science.* 1999; 284(5418): 1328–33. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1328>
4. Whitmire J.M., Merrell D.S. *Helicobacter pylori* genetic polymorphisms in gastric disease development. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019; 1149: 173–94. https://doi.org/10.1007/5584_2019_365
5. Foegeding N.J., Caston R.R., McClain M.S., Ohi M.D., Cover T.L. An overview of *Helicobacter pylori* VacA toxin biology. *Toxins (Basel).* 2016; 8(6): E173. <https://doi.org/10.3390/toxins8060173>
6. Atherton J.C., Cao P., Peek R.M.Jr., Tummuru M.K., Blaser M.J., Cover T.L. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J. Biol. Chem.* 1995; 270(30): 17771–7. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.30.17771>
7. Van Doorn L.J., Figueiredo C., Mégraud F., Pena S., Midolo P., Queiroz D.M., et al. Geographic distribution of vacA allelic types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol.* 1999; 116(4): 823–30. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(99\)70065-x](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(99)70065-x)
8. Tumuru M.K., Cover T.L., Blaser M.J. Cloning and expression of a high-molecular mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect. Immun.* 1993; 61(5): 1799–809. <https://doi.org/10.1128/iai.61.5.1799-1809.1993>
9. Yamaoka Y., Kodama T., Gutierrez O., Kim J.G., Kashima K., Graham D.Y. Relationship between *Helicobacter pylori* iceA, cagA, and vacA status and clinical outcome: studies in four different countries. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37(7): 2274–9. <https://doi.org/10.1128/jcm.37.7.2274-2279.1999>
10. van Doorn L.J., Figueiredo C., Sanna R., Plaisier A., Schneeberger P., de Boer W., et al. Clinical relevance of the cagA, vacA, and iceA status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol.* 1998; 115(1): 58–66. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(98\)70365-8](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(98)70365-8)
11. Miehke S., Kirsch C., Agha-Amiri K., Günther T., Lehn N., Malferteiner P., et al. The *Helicobacter pylori* vacA s1, m1 genotype and cagA is associated with gastric carcinoma in Germany. *Int. J. Cancer.* 2000; 87(3): 322–7.
12. Podzorski R.P., Podzorski D.S., Wuerth A., Tolia V. Analysis of the vacA, cagA, cagE, iceA, and babA2 genes in *Helicobacter pylori* from sixty-one pediatric patients from the Midwestern United States. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2003; 46(2): 83–8. [https://doi.org/10.1016/s0732-8893\(03\)00034-8](https://doi.org/10.1016/s0732-8893(03)00034-8)
13. Perng C.L., Lin H.J., Sun I.C., Tseng G.Y. *Helicobacter pylori* cagA, iceA and vacA status in Taiwanese patients with peptic ulcer and gastritis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2003; 18(11): 1244–9. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1746.2003.03214.x>
14. Uchida T., Miftahussurur M., Pittayanon R., Vilaichone R.K., Wisedopas N., Ratanachu-Ek T., et al. *Helicobacter pylori* infection in thailand: a nationwide study of the CagA phenotype. *PLoS One.* 2015; 10(9): e0136775. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136775>
15. Govorun V.M., Momynaliev K.T., Smirnova O.V., Chelysheva V.V., Kudryavtseva L.V., Sergienko V.I., et al. The modern approaches to molecular diagnostics and identification of *Helicobacter pylori* clinical isolates in Russia. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii.* 2002; 12(3): 57–65. (in Russian)
16. Spivak E.M., Levit R.M., Kuz'mina G.V., Demenchuk M.Yu. Influence of genetic characteristics of *Helicobacter pylori* on pathomorphology of gastric mucosa in young persons with chronic gastritis. *Bakteriologiya.* 2017; 2(4): 25–9. <https://doi.org/10.20953/2500-1027-2017-4-25-29> (in Russian)
17. Bereznyak E.A., Sorokin V.M., Karpova I.O., Stupina N.A., Terent'ev A.N. Genotype peculiarities of regional *Helicobacter pylori* strains from the Rostov district. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika.* 2013; (4): 30–3. (in Russian)
18. Sorokin V.M., Pisanov R.V., Vodop'yanov A.S., Golubkina E.V., Bereznyak E.A. Comparative analysis of genotypes of *Helicobacter pylori* strains in the Rostov and Astrakhan regions. *Meditssinskiy vestnik Yuga Rossii.* 2018; 9(4):81–6. <https://doi.org/10.21886/2219-8075-2018-9-4-81-86> (in Russian)
19. Abu-Taleb A.M.F., Abdelattef R.S., Abdel-Hady A.A., Omran F.H., El-Korashi L.A., Abdel-Aziz El-Hady H., et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* cagA and iceA genes and their association with gastrointestinal diseases. *Int. J. Microbiol.* 2018; 2018: 4809093. <https://doi.org/10.1155/2018/4809093>
20. Wei G.C., Chen J., Liu A.Y., Zhang M., Liu X.J., Liu D., et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA and iceA genotypes and correlation with clinical outcome. *Exp. Ther. Med.* 2012; 4(6): 1039–44. <https://doi.org/10.3892/etm.2012>
21. Boyanova L., Yordanov D., Gergova G., Markovska R., Mitov I. Association of iceA and babA genotypes in *Helicobacter pylori* strains with patient and strain characteristics. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2010; 98(3): 343–50. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9448-y>
22. Almeida N., Donato M.M., Romãozinho J.M., Luxo C., Cardoso O., Cipriano M.A., et al. Correlation of *Helicobacter pylori* genotypes with gastric histopathology in the central region of a South-European country. *Dig. Dis. Sci.* 2015; 60(1): 74–85. <https://doi.org/10.1007/s10620-014-3319-8>
23. Akhtereeva A.R., Davidyuk Yu.N., Fayzullina R.A., Ivanovskaya K.A., Safin A.G., Safina D.D., et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* genotypes in patients with gastroduodenal pathology in Kazan. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal.* 2017; (5): 723–8. <https://doi.org/10.17750/KMJ2017-723> (in Russian)
24. Momynaliev K., Smirnova O., Kudryavtseva L., Govorun V. *Helicobacter pylori* genotypes in Russia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2003; 22(9): 573–4. <https://doi.org/10.1007/s10096-003-0987-2>
25. Keikha M., Ali-Hassanzadeh M., Karbalaei M. Association of *Helicobacter pylori* vacA genotypes and peptic ulcer in Iranian population: a systematic review and meta-analysis. *BMC Gastroenterol.* 2020; 20(1): 266. <https://doi.org/10.1186/s12876-020-01406-9>
26. Ben Mansour K., Fendri C., Zribi M., Masmoudi A., Labbene M., Fillali A., et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA, iceA and oipA genotypes in Tunisian patients. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2010; 9: 10. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-9-10>
27. Ribeiro M.L., Godoy A.P., Benvenuto Y.H., Mendonça S., Pedrazzoli J. Jr. Clinical relevance of the cagA, vacA and iceA genotypes of *Helicobacter pylori* in Brazilian clinical isolates. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2003; 36(3): 181–5. [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(03\)00029-4](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(03)00029-4)
28. Lin H.J., Perng C.L., Lo W.C., Wu C.W., Tseng G.Y., Li A.F., et al. *Helicobacter pylori* cagA, iceA and vacA genotypes in patients with gastric cancer in Taiwan. *World J. Gastroenterol.* 2004; 10(17): 2493–7. <https://doi.org/10.3748/wjg.v10.i17.2493>
29. Erzin Y., Koksall V., Altun S., Dobrucali A., Aslan M., Erdamar S., et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA, cagE, iceA, babA2 genotypes and correlation with clinical outcome in Turkish patients with dyspepsia. *Helicobacter.* 2006; 11(6): 574–80. <https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2006.00461.x>
30. Marie M.A. Relationship between *Helicobacter pylori* virulence genes and clinical outcomes in Saudi patients. *J. Korean Med. Sci.* 2012; 27(2): 190–3. <https://doi.org/10.3346/jkms.2012.27.2.190>

Информация об авторах

Сварваль Алена Владимировна — к.м.н., зав. лаб. идентификации патогенов СПбНИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9340-4132>

Старкова Дарья Андреевна[✉] — к.б.н., с.н.с. лаб. идентификации патогенов, н.с. лаб. молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики СПбНИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, dariastarkova13@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-3199-8689>

Ферман Раиса Семеновна — м.н.с. лаб. идентификации патогенов СПбНИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7661-3725>

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 30.08.2022;
принята к публикации 01.11.2022;
опубликована 30.12.2022

Information about the authors

Alena V. Svarval — Cand. Sci. (Med.), Head, Department for identification of pathogens, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9340-4132>

Daria A. Starkova[✉] — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Department for identification of pathogens, Department of molecular epidemiology and evolutionary genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, dariastarkova13@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-3199-8689>

Raisa S. Ferman — researcher, Department for identification of pathogens, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7661-3725>

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 30.08.2022;
accepted for publication 01.11.2022;
published 30.12.2022



Влияние эфирного масла чабера горного на рост культур условно-патогенных микроорганизмов

Постникова О.Н.¹, Шевкопляс Л.А.¹, Куевда Т.А.², Сатаева Т.П.^{1✉},
Кирсанова М.А.¹, Логадырь Т.А.¹

¹Медицинская академия имени С.И. Георгиевского Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского, Симферополь, Россия;

²Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма, Симферополь, Россия

Аннотация

Введение. Эфирные масла содержат противомикробные компоненты, которые высокоактивны против широкого спектра микроорганизмов. Эфирные масла являются натуральными, экологически безопасными, низкотоксичными веществами, к ним не формируется резистентность микроорганизмов, они обладают минимальным перечнем побочных эффектов.

Целью исследований было изучение влияния эфирного масла чабера горного (*Satureja montana* L.) — МЧГ, растущего в Крыму, на рост культур условно-патогенных микроорганизмов.

Материалы и методы. Кратковременное действие МЧГ на рост референтных штаммов микроорганизмов исследовали в соответствии с Европейским стандартом определения скорости инактивации микроорганизмов исследуемым веществом (1997). Для изучения длительного воздействия МЧГ на клинические изоляты *Staphylococcus aureus* использовали метод разведений в жидкой среде с последующим измерением оптической плотности нарастания биомассы суспензионной культуры. Исследовали также влияние МЧГ на образование биоплёнок клиническими изолятами *S. aureus*.

Результаты. Цельное МЧГ и его разведения 1 : 10 и 1 : 100 при кратковременном действии (10–60 мин) полностью подавляли рост референтных штаммов условно-патогенных бактерий; рост референтного штамма *Candida albicans* ССМ 885 ингибировался только цельным МЧГ и разведением 1 : 10, а разведение МЧГ 1 : 100 оказывало бактериостатический эффект. Разведения МЧГ 1 : 100 и 1 : 1000 оказывали выраженное антибактериальное действие на суспензионную культуру клинических изолятов *S. aureus*. МЧГ подавляло образование биоплёнок 11 изолятами *S. aureus*.

Заключение. МЧГ проявляет выраженное антимикробное действие в отношении референтных штаммов *S. aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 и грибов *C. albicans* ССМ 885. Антибактериальное действие МЧГ на клинические изоляты *S. aureus* позволяет предлагать его в качестве компонента комбинированных препаратов для лечения инфекций, вызванных антибиотикоустойчивыми штаммами стафилококка.

Ключевые слова: эфирное масло чабера, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, биоплёнки, антимикробное действие

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Комитетом по этике Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского» (протокол № 12 от 14.12.2021).

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, программа «Приоритет-2030» № 075-15-2021-1323.

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

Для цитирования: Постникова О.Н., Шевкопляс Л.А., Куевда Т.А., Сатаева Т.П., Кирсанова М.А., Логадырь Т.А. Влияние эфирного масла чабера горного на рост культур условно-патогенных микроорганизмов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(6):701–707.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-262>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-262>

Effect of the essential oil of *Satureja montana* L. on the growth of cultures of conditionally pathogenic microorganisms

Olga N. Postnikova¹, Ludmila A. Shevkoplyas¹, Tatyana A. Kuevda²,
Tatiana P. Sataeva^{1✉}, Marina A. Kirsanova¹, Tatyana A. Logadyr¹

¹S.I. Georgievsky Medical Academy, V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia

²Research Institute of Agriculture of Crimea, Simferopol, Russia

Abstract

Introduction. Essential oils contain antimicrobial components that are highly active against a wide range of microorganisms. Essential oils are natural, environmentally safe, low-toxic substances with a minimal list of side effects; no antimicrobial resistance is formed to them.

The aim of the research was to study the influence of the essential oil of *Satureja montana* L., growing in the Crimea, on the growth of cultures of opportunistic microorganisms.

Materials and methods. The short-term effect of savory oil on the growth of reference strains of microorganisms was studied in accordance with the European Standard for determining the rate of inactivation of microorganisms by the test substance (1997). To study the long-term effect of savory oil on clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, we used the method of dilutions in a liquid medium, followed by measurement of the optical density of growth of the suspension culture biomass. The effect of savory oil on the formation of biofilms by clinical isolates of *S. aureus* was also studied.

Results. Whole savory oil and its dilutions of 1 : 10 and 1 : 100 with short-term action (10–60 min) completely suppressed the growth of reference strains of bacteria; growth of the reference strain *Candida albicans* CCM 885 was inhibited only by whole oil and a 1 : 10 dilution, while a 1 : 100 dilution had a bacteriostatic effect. Dilutions of essential oil 1 : 100 and 1 : 1000 had a pronounced antibacterial effect on the suspension culture of clinical isolates of *S. aureus*. Savory oil also inhibited biofilm formation by 11 isolates *S. aureus*.

Conclusion. The essential oil of *Satureja montana* L. exhibits a pronounced antimicrobial effect against reference strains of *S. aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 and fungi *C. albicans* CCM 885. The antibacterial effect of this essential oil on clinical isolates of *S. aureus* allows us to offer it as a component of combined preparations for the treatment of infections caused by antibiotic-resistant strains of staphylococcus.

Key words: essential oil of *Satureja montana* L., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, biofilms, antimicrobial activity

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the V.I. Vernadsky Crimean Federal University (protocol No. 12, December 14, 2021).

Funding source. The study was financially supported by the Ministry and Higher Education of the Russian Federation, program "Priority-2030" No. 075-15-2021-1323.

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

For citation: Postnikova O.N., Shevkoplyas L.A., Kuevda T.A., Sataeva T.P., Kirsanova M.A., Logadyr T.A. Effect of the essential oil of *Satureja montana* L. on the growth of cultures of conditionally pathogenic microorganisms. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii.* 2022;99(6):701–707. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-262>

Введение

Современные антимикробные препараты могут вызывать различные побочные эффекты при длительном применении, что ограничивает их использование в медицине. К тому же устойчивость микроорганизмов к синтетическим химиопрепаратам постоянно возрастает [1, 2].

Лекарственные травы и эфирные масла издавна служили в народной медицине для лечения и профилактики различных заболеваний, в том числе инфекционных, в пищевой промышленности, парфюмерии, мыловарении и т.д. [3].

Медицина является важным потребителем эфирных масел [4]. В Регистр лекарственных

средств РФ включены около 40 препаратов отечественного производства, содержащих эфирные масла и их компоненты. В основном это средства антисептического, противовоспалительного и ранозаживляющего действия [5, 6]. На протяжении многих лет изучались антимикробные свойства эфирных масел мяты, чабера, орегано, корицы, чайного дерева, гвоздики, эвкалипта и др. Доказано, что мишенями действия компонентов масел являются внутренние структуры микробной клетки [7].

Эфирные масла содержат противомикробные компоненты, которые высокоактивны против широкого спектра микроорганизмов, включая некоторые вирусы, микоплазмы и простейшие [8]. Эфирные

масла являются натуральными, экологически безопасными, низкотоксичными веществами, к ним не формируется резистентность микроорганизмов, они обладают минимальным перечнем побочных эффектов [9].

Крым является регионом, в котором традиционно возделываются эфиромасличные и лекарственные растения, поэтому возможно использовать данный потенциал для разработки новых отечественных антимикробных препаратов для лечения и профилактики инфекционных заболеваний [8, 10].

Чабер горный (*Satureja montana* L.) используют в кулинарии как пряность и консервант, в косметологии — как очищающее и успокаивающее средство для кожи, а также как средство против алопеции; он оказывает спазмолитическое, болеутоляющее, мочегонное, антидепрессивное, антиоксидантное и ряд других воздействий на организм человека и животных, что нашло применение в медицине и ветеринарии. В состав растения входят карвакрол, цимин, тимол, пинены, лимонен, цинеол, борнеол, терпинеол и ряд минорных компонентов, таких как р-кариофиллен, геранилацетат и др. — всего более 19 веществ, а также витамины А, В₁, В₆, РР, комплекс макро- и микроэлементов. Природные горечи и фитонциды чабера уничтожают патогенные микроорганизмы, а также плесневые грибы и гельминты. При этом эфирное масло чабера горного (МЧГ) обладает гораздо меньшими побочными эффектами, чем противогрибковые препараты группы полиенов: в 6,5 раза менее токсично, чем натриевая соль нистатина, и в 12,9 раза — чем амфотерицин В [8].

Целью исследования было изучение влияния эфирного МЧГ на рост культур условно-патогенных микроорганизмов.

Материалы и методы

Эфирное МЧГ (урожай 2019 г.) получали методом исчерпывающей гидропародистилляции из воздушно-сухого сырья [11]. Результаты хромато-масс-спектрометрического анализа показали, что в образцах МЧГ содержатся карвакрол (49,88%), пара-цимен (15,76%), γ -терпинен (15,28%), α -пинен (2,52%), α -терпинен (2,07%) и тимол (0,23%).

Изучение антимикробной активности МЧГ проводили на референтных штаммах *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 и дрожжеподобных грибах *Candida albicans* ССМ 885 из коллекции живых культур кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Медицинской академии им. С.И. Георгиевского. Для ряда экспериментов также использовали 9 клинических изолятов *S. aureus*, выделенных из зева давших добровольное информированное согласие пациентов Городской больницы г. Симферополя № 7 с различ-

ной ЛОР-патологией (690, 701, 713, 718, 720, 752, 760, 762, 766), и 2 изолята *S. aureus*, выделенные из морской воды вблизи стока городской канализации г. Судак (М1 и М3).

Протокол исследования одобрен Комитетом по этике Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского» (протокол № 12 от 14.12.2021).

Кратковременное действие МЧГ на рост референтных штаммов микроорганизмов исследовали в соответствии с Европейским стандартом определения скорости инактивации микроорганизмов исследуемым веществом [12]. Использовали цельное МЧГ, а также его водные эмульсии в соотношении объёмов (v/v) масло : вода — 1 : 10 и 1 : 100. В контрольных вариантах культуры инкубировали в стерильной дистиллированной воде, в вариантах опыта микроорганизмы вносили в соответствующие разбавления МЧГ. Во всех образцах использовали суспензию суточных культур плотностью 10 ед. мутности для бактерий и 20 ед. мутности для грибов по стандарту Государственного научно-исследовательского института стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича. Пробы перемешивали на лабораторном встряхивателе со скоростью 150 об/мин в течение 10–60 мин. Через 10 мин и 1 ч из контрольного и опытных образцов производили посев на мясопептонный агар для бактерий и среду Сабуро для грибов по методу Голда [13]. Результат учитывали через 24 ч роста в термостате при 37°C.

Для изучения длительного воздействия МЧГ на клинические изоляты *S. aureus* бактерии культивировали в 96-луночном планшете. Из суточных культур бактерий готовили суспензии плотностью 10 ед. мутности по стандарту ГИСК им. Л.А. Тарасевича. Объём инокулята составлял 20 мкл. Исследовали антибактериальное действие разведений МЧГ 1 : 100 и 1 : 1000 (v/v) в ростовой среде. Контролем служили образцы с культурами без добавления МЧГ. В начале опыта, а затем через каждый час в течение 24 ч роста при 37°C измеряли оптическую плотность суспензий бактерий при длине волны 540 нм с помощью прибора «Multiscan». Оптическая плотность среды при 540 нм составляла 0,267. Подавление роста стафилококков в опытных образцах сравнивали с контрольными, разницу выражали в процентах. Через 24 ч из образцов суспензионных культур производили посев на мясо-пептонный и желточно-солевой агары в чашки Петри для оценки характера подавления роста бактерий МЧГ. Бактерицидным действием считали отсутствие роста бактерий на среде, бактериостатическим — наличие колоний.

Влияние МЧГ на образование биоплёнок клиническими изолятами *S. aureus* исследовали в 96-луночном планшете по методу [14]. Использовали разведение МЧГ в среде (v/v) 1 : 10. Плотность биоплёнок оценивали через 24 ч при 620 нм по ин-

тенсивности окраски экстрагированного этанолом генцианвиолета, связанного бактериями биоплёнки.

Статистическую обработку результатов исследования проводили, вычисляя среднее арифметическое значение (M) из 8 повторений, ошибку среднего арифметического значения (m), и представляли в виде $M \pm m$. После проведения проверки вариационных рядов на нормальность распределения согласно критерию Шапиро–Уилка различия между контрольными и опытными значениями оптической плотности оценивали при помощи критерия Стьюдента, достоверными считали результаты при $p \leq 0,05$.

Результаты

Результаты кратковременного (10–60 мин) действия цельного МЧГ, а также его разведений 1 : 10 и 1 : 100 на рост *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 и дрожжеподобных грибов *C. albicans* ССМ 885 представлены в **табл. 1**.

Как показали проведённые исследования, цельное МЧГ, а также его разведения 1 : 10 и 1 : 100 при кратковременном действии (10–60 мин) полностью подавляли рост референтных штаммов условно-патогенных бактерий; рост штамма *C. albicans* ССМ 885 ингибировался цельным МЧГ и его разведением 1 : 10, а разведение МЧГ 1 : 100 оказывало бактериостатический эффект, снижая количество микроорганизмов в 100 раз.

Результаты длительного (24 ч) действия разведения 1 : 100 МЧГ на суспензионные культуры клинических изолятов *S. aureus* представлены в **табл. 2**.

Показатели оптической плотности культур клинических изолятов и референтного штамма *S. aureus* в среде с добавлением разведения МЧГ в разведении 1 : 100 незначительно отличались от плотности среды без бактерий (0,267), варьируя от 0,293 до 0,357, в то время как значения плотности при росте тех же культур без МЧГ составляли 0,610–0,901, в зависимости от изолята бактерий. При разведении МЧГ 1 : 1000 показатели роста были схожи с таковыми при разведении 1 : 100. В целом ингибирование роста составляло более 50%. Таким образом, разведения МЧГ 1 : 100 и 1 : 1000 оказывали выраженное антибактериальное действие на культуры золотистого стафилококка, степень кото-

рого зависела от изолята бактерий. Для определения характера действия МЧГ после 24 ч культивирования производили высеивание суспензионной культуры на мясо-пептонный и желточно-солевой агары. Рост колоний бактерий наблюдался у референтного штамма *S. aureus* ATCC 25923 и изолятов 701, 720, 752, 760, 762, 766, что говорит о бактериостатическом действии эфирного МЧГ на эти культуры. Рост бактерий отсутствовал у изолятов 713, 718, 690, что свидетельствует о бактерицидном эффекте.

Важным показателем антимикробного действия веществ является их способность влиять на биоплёнокообразование микроорганизмов. Воздействие МЧГ в разведении 1 : 10 на способность бактерий образовывать биоплёнки изучали у клинических изолятов, а также у 2 культур *S. aureus*, выделенных из морской воды вблизи стока городской канализации. Восемь из 9 клинических изолятов и 2 культуры из морской воды были устойчивы к полусинтетическому бета-лактаму антибиотику амоксициллину. Три изолята продемонстрировали устойчивость к 14- и 15-членным макролидам и офлоксацину, 5 культур были умеренно устойчивы к макролидам. Три изолята (752, 762 и 760) были одновременно устойчивыми к препаратам из разных групп (амоксициллину, офлоксацину, макролидам). Оба изолята *S. aureus*, выделенные из моря вблизи стока городской канализации, были устойчивыми к макролидам и амоксициллину, М1 обладал также резистентностью к гентамицину. Все выделенные культуры относились к фенотипу MSSA. Контролем служил вариант с добавлением масла в среду, без бактерий. Результаты представлены в **табл. 3**.

Плотность биоплёнок стафилококков при добавлении МЧГ в разведении 1 : 10 незначительно превышала значение 0,111 в образце среды без бактерий: показатель оптической плотности колебался от 0,156 (изолят 752) до 0,207 (изолят М3). Значения оптической плотности при добавлении МЧГ к культурам стафилококка у всех 11 изолятов было в 2–4 раза меньше, чем в соответствующем контрольном образце. Для большинства изолятов ингибирование роста составляло более 50% от контроля, у культур 690, М1 и М3 оно было примерно 75%. Следовательно, МЧГ подавляло образование

Таблица 1. Число КОЕ/мл культур условно-патогенных микроорганизмов при кратковременном воздействии МЧГ и его разведений

Table 1. The number of CFU/ml of cultures of conditionally pathogenic microorganisms with short-term exposure to savory essential oil and its dilutions

Время воздействия, мин Exposure time, min	<i>S. aureus</i> ATCC 25923, КОЕ/мл CFU/ml				<i>E. coli</i> ATCC 25922, КОЕ/мл CFU/ml				<i>C. albicans</i> ССМ 885, КОЕ/мл CFU/ml			
	контроль control	1 : 1	1 : 10	1 : 100	контроль control	1 : 1	1 : 10	1 : 100	контроль control	1 : 1	1 : 10	1 : 100
10	10 ⁵	0	0	0	10 ⁵	0	0	0	10 ⁵	0	0	10 ³
60	10 ⁴	0	0	0	10 ⁵	0	0	0	5 × 10 ⁴	0	0	10 ³

Таблица 2. Оптическая плотность биомассы суспензионных культур *S. aureus* при воздействии разведения МЧГ 1 : 100 ($\lambda = 540$ нм)

Table 2. Optical density of biomass suspension cultures *S. aureus* exposed to a 1:100 dilution of savory essential oil ($\lambda = 540$ nm)

Разведение МЧГ Savory oil dilution	Оптическая плотность среды Optical density of medium	Оптическая плотность культур <i>S. aureus</i> * Optical density of <i>S. aureus</i> cultures*									
		ATCC 25923	690	701	713	718	720	752	760	762	766
Контроль Control	0,267	0,610 ± 0,017	0,780 ± 0,020	0,657 ± 0,016	0,770 ± 0,020	0,762 ± 0,022	0,634 ± 0,024	0,862 ± 0,032	0,901 ± 0,024	0,869 ± 0,022	0,783 ± 0,021
1 : 100		0,293 ± 0,013*	0,309 ± 0,012*	0,299 ± 0,012*	0,301 ± 0,011*	0,302 ± 0,012*	0,313 ± 0,014*	0,316 ± 0,015*	0,345 ± 0,012*	0,345 ± 0,014*	0,357 ± 0,013*
% к контролю % to control	–	48,0 ± 4,0	39,6 ± 2,5	45,5 ± 3,0	39,1 ± 2,5	39,6 ± 2,8	49,4 ± 4,1	36,7 ± 3,1	38,3 ± 2,4	39,7 ± 2,6	45,6 ± 3,0
1 : 1000	0,267	0,291 ± 0,013*	0,305 ± 0,016*	0,301 ± 0,015*	0,306 ± 0,017*	0,304 ± 0,014*	0,316 ± 0,017*	0,326 ± 0,015*	0,335 ± 0,016*	0,339 ± 0,020*	0,362 ± 0,018*
% к контролю % to control	–	48,0 ± 3,7	39,1 ± 3,0	45,8 ± 3,5	39,7 ± 3,3	39,9 ± 3,0	49,8 ± 5,0	37,8 ± 3,0	37,2 ± 2,8	39,0 ± 3,3	46,2 ± 3,7
Рост на среде Growth on medium	–	+	–	+	–	–	+	+	+	+	+

Примечание. * $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем.
Note. * $p \leq 0.05$ compared to the control.

Таблица 3. Оптическая плотность биоплёнок культур *S. aureus* при воздействии разведения МЧГ 1 : 10 ($\lambda = 620$ нм)

Table 3. Optical density of biofilms of *S. aureus* cultures exposed to dilution of savory essential oil 1 : 10 ($\lambda = 620$ nm)

Оптическая плотность среды Optical density of medium	Плотность биоплёнок культур <i>S. aureus</i> <i>S. aureus</i> biofilm density										
	690	701	713	718	720	752	760	762	766	M1	M3
Контроль Control	0,732 ± 0,018	0,412 ± 0,016	0,532 ± 0,017	0,381 ± 0,014	0,393 ± 0,014	0,365 ± 0,014	0,435 ± 0,015	0,443 ± 0,015	0,434 ± 0,015	0,768 ± 0,019	0,814 ± 0,018
МЧГ Savory oil	0,161 ± 0,011*	0,180 ± 0,012*	0,206 ± 0,012*	0,205 ± 0,013*	0,191 ± 0,012*	0,156 ± 0,011*	0,184 ± 0,012*	0,190 ± 0,013*	0,189 ± 0,014*	0,205 ± 0,014*	0,207 ± 0,014*
% к контролю % to control	22,0 ± 2,60	43,7 ± 2,81	38,7 ± 3,50	53,8 ± 4,14	48,6 ± 3,59	42,7 ± 2,94	42,3 ± 2,69	42,9 ± 3,08	43,5 ± 3,16	26,7 ± 2,63	25,4 ± 2,14

Примечание. * $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем.
Note. * $p \leq 0.05$ compared to the control.

биоплёнок 9 клиническими изолятами *S. aureus* и 2 культурами, выделенными из морской воды.

Обсуждение

При изучении кратковременного действия МЧГ оказывало бактерицидное действие на рост референтных штаммов *E. coli* ATCC 25922 и *S. aureus* ATCC 2592. Рост референтного штамма *C. albicans* ССМ 885 ингибировался только цельным МЧГ и разведением 1 : 10, а МЧГ в разведении 1 : 100 оказывало бактериостатический эффект.

Эти результаты коррелируют с данными других авторов, в исследованиях которых добавление эфирного масла чабера садового вдвое усиливало бактериостатический и бактерицидный эффекты 40% этанола по отношению к *E. coli* [15]. В ряде других исследований показано, что фракция МЧГ обладает мощным фунгицидным действием в отношении грибов *C. albicans*, *C. tropicalis*, *Aspergillus*

fumigatus, *A. niger*, *Penicillium* sp., *Acremonium falciforme*, выделенных от больных с хроническими инфекционно-воспалительными заболеваниями [8].

Одним из направлений решения проблемы устойчивости клинических штаммов золотистого стафилококка к химиопрепаратам является использование натуральных веществ растительного происхождения, в том числе эфирных масел [16, 17]. Наши исследования показали, что МЧГ в разведениях 1 : 100 и 1 : 1000 оказывает бактериостатический эффект в отношении 70% культур золотистого стафилококка (7 изолятов) и бактерицидный эффект в отношении 30% (3 изолята). При исследованиях свойств эфирных масел растений, принадлежавших к тому же семейству, что и чабер, — душицы и тимьяна, также был выявлен антибактериальный эффект по отношению к клиническим изолятам *S. aureus* [18].

Важным критерием антимикробного действия различных веществ является не только подавление

роста суспензионных культур микроорганизмов, но и воздействие на способность микроорганизма образовывать биоплёнки. В нашем исследовании МЧГ подавляло образование биоплёнки ряда изолятов *S. aureus*, снижая плотность образования биоплёнки в вариантах с добавлением МЧГ по отношению к контролю в 2–4 раза в зависимости от культуры. Эти результаты коррелируют с данными других авторов, в исследованиях которых показано ингибирование образования биоплёнок клиническими штаммами *S. aureus* под воздействием эфирных масел душицы обыкновенной, тимьяна обыкновенного и тимьяна даенского (семейство Яснотковые) [8, 19]. Эфирное масло душицы обыкновенной и тимьяна даенского, как и МЧГ, содержат карвакрол — фенольное соединение, обладающее высокой антибактериальной активностью. Кроме того, чабер горный, как и некоторые другие представители семейства Яснотковых (душица, тимьян), содержит тимол и терпинен [19].

Заклучение

Эфирное масло чабера горного (*Satureja montana* L.) проявляет выраженное антимикробное действие в отношении референтных штаммов бактерий *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 и грибов *C. albicans* ССМ 885, что делает перспективным дальнейшие исследования данного растительного продукта. Антибактериальное действие МЧГ на клинические изоляты *S. aureus* позволяет предлагать его в качестве компонента комбинированных препаратов для лечения инфекций, вызванных антибиотикоустойчивыми штаммами стафилококка.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Егоров А.М., Сазыкин Ю.О. Микроэволюция патогена во время инфекционного процесса. *Антибиотики и химиотерапия*. 2000; (1): 3–5.
- Fisher B. Epidemiology of Mycobacterial resistance (especially *Mycobacterium tuberculosis*). *Chemotherapy*. 1999; 45(2): 109–20. <https://doi.org/10.1159/000007172>
- Ju J., Xie Y., Guo Y., Cheng Y., Qian H., Yao W. Application of edible coating with essential oil in food preservation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2018; 59(15): 2467–80. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1456402>
- Аюпова Р.Б., Сакипова З.Б., Дильбарханов Р.Д. Эфирные масла: достижения и перспективы, современные тенденции изучения и применения. *Вестник Казахского Национального медицинского университета*. 2013; 5(3): 74–8.
- Тихомиров А.А. Принципы использования эфирных масел для медицинских целей. *Сборник научных трудов Государственного Никитского ботанического сада*. 2014; 139: 116–26.
- Man A., Santacrose L., Jacob R., Mare A., Man L. Antimicrobial activity of six essential oils against a group of human pathogens: A comparative study. *Pathogens*. 2019; 8(1): 15. <https://doi.org/10.3390/pathogens8010015>
- Carneiro V.A., Melo R.S., Pereira A.M.G., Azevedo A.M.A., Matos M.N.C. et al. Essential oils as an innovative approach against biofilm of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. 2020. Available at: <https://www.intechopen.com/chapters/71796>

- Паштецкий В.С., Невкрытая Н.В. Использование эфирных масел в медицине, ароматерапии, ветеринарии, растениеводстве. *Таврический вестник аграрной науки*. 2018; (1): 16–38. <https://doi.org/10.25637/TVAN2018.01.02>
- Шестопалова Н.Н., Тимошенко Е.Ю., Казакова В.С., Сорокопудов В.Н., Сорокопудова О.А. Электронная база данных по эфиромасличным растениям и эфирным маслам на их основе, применяемым в ароматерапии. *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация*. 2012; (10-3): 65–8.
- Паштецкий В.С., Невкрытая Н.В., Мишнев А.В. История, современное состояние и перспективы развития эфиромасличной отрасли. *Аграрный вестник Урала*. 2017; (11): 7.
- Ефремов А.А. Метод исчерпывающей гидропародистиляции при получении эфирных масел дикорастущих растений. *Успехи современного естествознания*. 2013; (7): 88–94.
- European Committee for Standardization. *Chemical and anti-septics. Basic Bacterial Activity: Test Methods and Requirements (phase 1). European Standard EN 1040*. Brussels: European Committee for Standardization; 1997.
- Gould J.C. Quantity and quality in the diagnosis of urinary tract infections. *Br. J. Urol.* 1965; 37: 7–12. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410x.1965.tb09567.x>
- O'Toole G.A., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 2000; 54: 49–79. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49>
- Kotyuk L.A. Antimicrobial activity of ethanol extract of *Satureja hortensis* L. towards pathogenic microbial strains. *Biological Bulletin of Bogdan Chmelniyskiy Melitopol State Pedagogical University*. 2014; 4(3): 109–24. <https://doi.org/10.7905/bbmspu.v4i3.898> (in Ukrainian)
- Уткина Т.М., Потехина Л.П., Выльшева И.В., Карташова О.Л. Влияние эфирных масел полыни на рост и персистентные свойства стафилококков. *Современные проблемы науки и образования*. 2012; (6): 548.
- Edwards-Jones V., Buck R., Shawcross S.G., Dawson M.M., Dunn K. The effect of essential oils on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using a dressing model. *Burns*. 2004; 30(8): 771–7. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2004.06.006>
- Xiao S., Cui P., Shi W., Zhang Y. Identification of essential oils with activity against stationary phase *Staphylococcus aureus*. *BMC Complement Med. Ther.* 2020; 20(1): 99. <https://doi.org/10.1186/s12906-020-02898-4>
- Vázquez-Sánchez D., Cabo M.L., Rodríguez-Herrera J.J. Antimicrobial activity of essential oils against *Staphylococcus aureus* biofilms. *Food Sci. Technol. Int.* 2015; 21(8): 559–70. <https://doi.org/10.1177/1082013214553996>

REFERENCES

- Egorov A.M., Sazykin Yu.O. Microevolution is pathogenic during the infectious process. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2000; (1): 3–5. (in Russian)
- Fisher B. Epidemiology of Mycobacterial resistance (especially *Mycobacterium tuberculosis*). *Chemotherapy*. 1999; 45(2): 109–20. <https://doi.org/10.1159/000007172>
- Ju J., Xie Y., Guo Y., Cheng Y., Qian H., Yao W. Application of edible coating with essential oil in food preservation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2018; 59(15): 2467–80. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1456402>
- Ayupova R.B., Sakipova Z.B., Dil'barkhanov R.D. Essential oils plants and essential oils: progress and perspectives, modern tendencies of research and application. *Vestnik Kazakhskogo Natsional'nogo meditsinskogo universiteta*. 2013; 5(3): 74–8. (in Russian)
- Tikhomirov A.A. Principles of essential oils use with the medicinal purposes. a literature review. *Sbornik nauchnykh trudov Gosudarstvennogo Nikitskogo botanicheskogo sada*. 2014; 139: 116–26. (in Russian)

6. Man A., Santacroce L., Jacob R., Mare A., Man L. Antimicrobial activity of six essential oils against a group of human pathogens: A comparative study. *Pathogens*. 2019; 8(1): 15. <https://doi.org/10.3390/pathogens8010015>
7. Carneiro V.A., Melo R.S., Pereira A.M.G., Azevedo A.M.A., Matos M.N.C. et al. Essential oils as an innovative approach against biofilm of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. 2020. Available at: <https://www.intechopen.com/chapters/71796>
8. Pashetskiy V.S., Nevkrytaya N.V. Use of essential oils in medicine, aromatherapy, veterinary and crop production (review). *Tavrisheskiy vestnik agrarnoy nauki*. 2018; (1): 16–38. <https://doi.org/10.25637/TVAN2018.01.02> (in Russian)
9. Shestopalova N.N., Timoshenko E.Yu., Kazakova V.S., Sorokopudov V.N., Sorokopudova O.A. Electronic database of essential oil plants and essential oils based on them used in aromatherapy. *Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Meditsina. Farmatsiya*. 2012; (10-3): 65–8. (in Russian)
10. Pashetskiy V.S., Nevkrytaya N.V., Mishnev A.V. History, current state and development prospects of the essential oil industry. *Agrarnyy vestnik Urala*. 2017; (11): 7. (in Russian)
11. Efremov A.A. The method of comprehensive hydro-steam distillation in obtaining essential oils of wild plants. *Uspekhi sovremennoy estestvoznaniya*. 2013; (7): 88–94. (in Russian)
12. European Committee for Standardization. *Chemical and antiseptics. Basic Bacterial Activity: Test Methods and Requirements (phase 1). European Standard EN 1040*. Brussels: European Committee for Standardization; 1997.
13. Gould J.C. Quantity and quality in the diagnosis of urinary tract infections. *Br. J. Urol*. 1965; 37: 7–12. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410x.1965.tb09567.x>
14. O'Toole G.A., Kaplan H.B., Koller R. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol*. 2000; 54: 49–79. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49>
15. Kotyuk L.A. Antimicrobial activity of ethanol extract of *Satureja hortensis* L. towards pathogenic microbial strains. *Biological Bulletin of Bogdan Chmelnytskyi Melitopol State Pedagogical University*. 2014; 4(3): 109–24. <https://doi.org/10.7905/bbmspu.v4i3.898> (in Ukrainian)
16. Utkina T.M., Potekhina L.P., Vylysheva I.V., Kartashova O.L. Influence of essential oils of wormwood on growth and persistence properties of *Staphylococcus* sp. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya*. 2012; (6): 548. (in Russian)
17. Edwards-Jones V., Buck R., Shawcross S.G., Dawson M.M., Dunn K. The effect of essential oils on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using a dressing model. *Burns*. 2004; 30(8): 771–7. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2004.06.006>
18. Xiao S., Cui P., Shi W., Zhang Y. Identification of essential oils with activity against stationary phase *Staphylococcus aureus*. *BMC Complement Med. Ther*. 2020; 20(1): 99. <https://doi.org/10.1186/s12906-020-02898-4>
19. Vázquez-Sánchez D., Cabo M.L., Rodríguez-Herrera J.J. Antimicrobial activity of essential oils against *Staphylococcus aureus* biofilms. *Food Sci. Technol. Int*. 2015; 21(8): 559–70. <https://doi.org/10.1177/1082013214553996>

Информация об авторах

Постникова Ольга Николаевна — старший преподаватель каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии Медицинской академии им. С.И. Георгиевского КФУ им. В.И. Вернадского, Симферополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2113-4107>

Шевкопляс Людмила Александровна — ассистент каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии Медицинской академии им. С.И. Георгиевского КФУ им. В.И. Вернадского, Симферополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1166-4585>

Кувейда Татьяна Алексеевна — м.н.с. отд. полевых культур НИИ сельского хозяйства Крыма, Симферополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0055-8605>

Сатаева Татьяна Павловна — д.м.н., зав. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии Медицинской академии им. С.И. Георгиевского КФУ им. В.И. Вернадского, Симферополь, Россия, tanzcool@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6451-7285>

Кирсанова Марина Александровна — к.б.н., доц. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии Медицинской академии им. С.И. Георгиевского КФУ им. В.И. Вернадского, Симферополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5559-005>

Логадыр Татьяна Алексеевна — к.м.н., доц. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии Медицинской академии им. С.И. Георгиевского КФУ им. В.И. Вернадского, Симферополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2470-5374>

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 12.07.2022;
принята к публикации 01.11.2022;
опубликована 30.12.2022

Information about the authors

Olga N. Postnikova — senior lecturer, Department of microbiology, virology and immunology, S.I. Georgievsky Medical Academy, V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2113-4107>

Ludmila A. Shevkoptyas — assistant, Department of microbiology, virology and immunology, S.I. Georgievsky Medical Academy, V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1166-4585>

Tatyana A. Kuevda — junior researcher, Department of field crop, Research Institute of Agriculture of Crimea, Simferopol, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0055-8605>

Tatiana P. Sataeva — D. Sci. (Med.), Head, Department of microbiology, virology and immunology, S.I. Georgievsky Medical Academy, V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia, tanzcool@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6451-7285>

Marina A. Kirsanova — Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Department of microbiology, virology and immunology, S.I. Georgievsky Medical Academy, V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5559-005>

Tatyana A. Logadyr — Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of microbiology, virology and immunology, S.I. Georgievsky Medical Academy, V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2470-5374>

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 12.07.2022;
accepted for publication 01.11.2022;
published 30.12.2022

ОБЗОРЫ

Научный обзор

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-323>

Механизмы формирования толерантности Toll-подобных рецепторов под действием микробных лигандов

Булгакова И.Д.^{1,2}, Свитич О.А.^{1,2}, Зверев В.В.^{1,2}¹Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

Аннотация

Некоторые микроорганизмы способны формировать толерантность. С одной стороны, это позволяет патогенным микробам ускользать от иммунного надзора, с другой стороны — даёт возможность представителям микробиоты колонизировать различные биотопы и выстраивать симбиотические отношения с макроорганизмом. Сложные регуляторные взаимодействия врождённого и адаптивного иммунитета, а также стимуляция антигенами позволяют микробам управлять состоянием иммунологической толерантности. Важную роль в этом процессе играют клетки врождённого иммунитета, которые распознают компоненты микробов при помощи паттерн-распознающих рецепторов. Основным классом этих рецепторов являются Toll-подобные рецепторы (TLRs). При этом, несмотря на универсальность активируемых сигнальных путей, можно наблюдать различные клеточные ответы при взаимодействии TLRs с представителями микробиоты и патогенными микробами, они также будут различаться при острой и хронической инфекции. Изучение механизмов формирования толерантности TLRs имеет большую ценность, поскольку эти рецепторы вовлечены в широкий спектр инфекционных и неинфекционных заболеваний, а также играют важную роль в развитии аллергических, аутоиммунных патологий и онкологических заболеваний. Понимание механизмов формирования толерантности TLRs может также внести существенный вклад в разработку препаратов на основе лигандов этих рецепторов для лечения и профилактики многих заболеваний.

Ключевые слова: Toll-подобные рецепторы, паттерн-распознающие рецепторы, иммунологическая толерантность, эндотоксин-индуцированная толерантность, врождённый иммунитет, микробиота, PAMPs, эндотоксин, липополисахарид, обзор

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: Булгакова И.Д., Свитич О.А., Зверев В.В. Механизмы формирования толерантности Toll-подобных рецепторов под действием микробных лигандов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(6):708–721.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-323>

Review article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-323>

Mechanisms of Toll-like receptor tolerance induced by microbial ligands

Irina D. Bulgakova^{1,2}, Oksana A. Svitich^{1,2}, Vitaly V. Zverev^{1,2}¹I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia;²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Abstract

Some microorganisms can develop tolerance. On the one hand, it allows pathogenic microbes to escape immune surveillance, on the other hand, it provides the possibility to microbiota representatives to colonize different biotopes and build a symbiotic relationship with the host. Complex regulatory interactions between innate and adaptive immune systems as well as stimulation by antigens help microbes control and maintain immunological tolerance. An important role in this process belongs to innate immune cells, which recognize microbial components through pattern-recognition receptors. Toll-like receptors (TLRs) represent the main class of these receptors. Despite the universality of the activated signaling pathways, different cellular responses are induced by interaction of TLRs with microbiota representatives and pathogenic microbes, and they vary during acute and chronic infection. The research on mechanisms underlying the development of TLR tolerance is significant, as the above receptors are involved in a wide range of infectious and noninfectious diseases; they also play an important role in development of allergic diseases, autoimmune diseases, and cancers. The knowledge of TLR tolerance mechanisms can be critically important for development of TLR ligand-based therapeutic agents for treatment and prevention of multiple diseases.

Keywords: *Toll-like receptors, pattern-recognition receptors, immunological tolerance, endotoxin-induced tolerance, innate immunity, microbiota, PAMPs, endotoxin, lipopolysaccharide, review*

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: Bulgakova I.D., Svitich O.A., Zverev V.V. Mechanisms of Toll-like receptor tolerance induced by microbial ligands. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(6):708–721.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-323>

Введение

Иммунологическая толерантность — это состояние, при котором не происходит активации лимфоцитов в присутствии определённого антигена. В соответствии с клонально-селекционной теорией Ф.М. Бернета, рецепторы лимфоцитов, распознающие антигены, распределены в популяции клонально, а реакция на связывание антигена зависит от степени зрелости этих лимфоцитов. Таким образом формируется толерантность к антигенам, попадающим в организм до наступления иммунологической зрелости [1–3]. Представители микробиоты начинают колонизировать организм новорождённого и образовывать уникальные микробные сообщества как раз в тот момент, когда созревание иммунной системы ещё не завершено [4]. Метаболиты и компоненты клеток представителей микробиоты, попадая в кровоток, меняют функциональную настройку иммунной системы хозяина, в том числе регулируют чувствительность рецепторов врождённого иммунитета, к которым относятся Toll-подобные рецепторы (TLRs) [5].

Известны попытки объяснить механизмы изменения чувствительности этих рецепторов в рамках рецепторной, рецепторно-сигнальной и эпигенетической теорий [6], однако концепция, которая могла бы объединить все данные, полученные при исследовании толерантности TLRs, не сложилась. Более детальное изучение различных типов TLRs, их лигандов, активируемых внутриклеточных сигнальных путей, анализ генов, а также особенностей эпигенетической регуляции позволят раскрыть механизмы формирования толерантности TLRs.

TLRs — это рецепторы врождённого иммунитета, способные распознавать PAMPs (пато-

ген-ассоциированные молекулярные структуры) и DAMPs (молекулярные фрагменты, ассоциированные с повреждениями). У человека выделены 10 типов TLRs: TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10 относятся к рецепторам цитоплазматической мембраны, а TLR3, TLR7, TLR8 и TLR9 располагаются на эндолизосомальной мембране [7, 8]. После связывания лиганда TLRs образуют гомо- или гетеродимеры, происходит рекрутирование компонентов сигнальных путей, которые включают в себя адаптерные белки, киназы и факторы транскрипции. Схема сигнальных путей TLRs представлена на **рис. 1** [7, 9, 10]. Каждый сигнальный путь связан с образованием надмолекулярного организующего центра (supramolecular organizing centre — SMOC). Все TLRs, кроме TLR3, участвуют в активации MyD88-зависимого пути, в котором SMOC представлен миддосомой, в основе которой лежит цитозольный адаптерный белок MyD88. Вовлечение этого сигнального пути приводит к активации факторов транскрипции AP-1, NF-κB, IRF5, в результате чего индуцируется экспрессия антимикробных факторов и медиаторов воспаления, а также осуществляется регуляция апоптоза [7, 11]. Через рецепторы TLR3 и TLR4 реализуются эффекты MyD88-независимого сигнального пути, центральным звеном которого является белок TRIF, который участвует в образовании другого SMOC — триффосомы. В результате вовлечения этого пути происходит активация транскрипционного фактора IRF3, ответственного за экспрессию интерферонов I типа. Кроме того, существуют и другие эффекты, связанные TLRs, которые присутствуют у неиммунных клеток [7, 11, 12].

Исходя из вышеописанного, можно сделать вывод, что TLRs являются полифункциональными

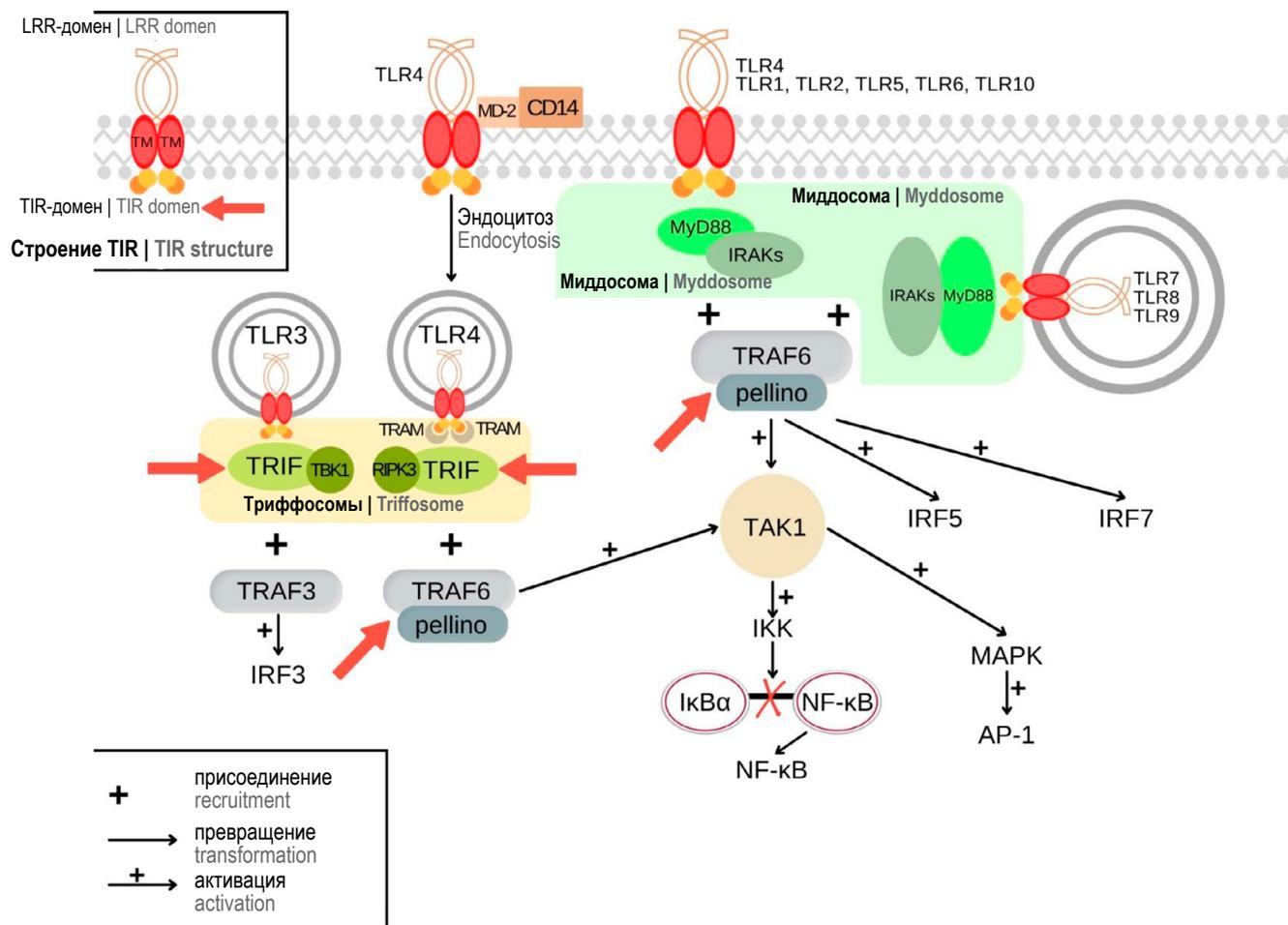


Рис. 1. Сигнальные пути TLRs, сборка миддосомы и триффосомы.

Красными стрелками указаны возможные механизмы формирования толерантности на уровне образования SMOCs.

Fig. 1. TLR signaling pathways, myddosome and triffosome assembly.

Red arrows show the possible mechanisms underlying tolerance development at the SMOC level.

и существуют определённые механизмы, позволяющие «переключать» клеточные ответы в различных условиях. При этом, за некоторым исключением, тип лиганда значения не имеет. Среди лигандов TLRs есть экзогенные и эндогенные вещества. Экзогенные лиганды (PAMPs) представлены липополисахаридом (ЛПС), пептидогликаном, тейхоевыми и липотейхоевыми кислотами, флагеллином, зимозаном, ДНК и РНК вирусов, аналогами нуклеозидов и др. Некоторые типы рецепторов преимущественно чувствительны к компонентам определённых микробов: грамположительных (TLR1, TLR2, TLR6) и граммотрицательных (TLR4, TLR5) бактерий, вирусов (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9), простейших и грибов (TLR1, TLR2, TLR6). В качестве эндогенных лигандов могут выступать различные DAMPs, например, белки теплового шока (Hsp60, Hsp70, Hsp96), дефензины, фибриноген [13, 14].

Несмотря на огромный спектр лигандов, до сих пор точно не известно, почему в одних случаях возникает ответ на стимуляцию TLRs, а в других нет, какие механизмы регулируют эти процессы,

играет ли роль природа лиганда, его количество, частота стимуляции TLRs, тип клеток и т.д. Попробовать ответить на эти вопросы можно, изучив более подробно такое явление, как толерантность TLRs.

Толерантность TLRs

Толерантность TLRs — это отсутствие или снижение эффектов от стимуляции TLRs. Ранние исследования на моделях *in vivo* привели к ошибочному предположению, что лихорадка может являться показателем чувствительности TLRs к эндотоксинам, в связи с чем механизм развития толерантности TLRs рассматривался как десенсибилизация этих рецепторов. С открытием конкретных механизмов передачи внутриклеточных сигналов вследствие лигирования TLRs стало очевидно, что толерантность развивается не из-за десенсибилизации рецепторов, а благодаря изменённой реакции на стимуляцию. Впервые это было продемонстрировано на примере TLR4, а в качестве лиганда использовали эндотоксин [15]. Наблюдаемый феномен обозначили термином «ЛПС-индуцированная толерантность», однако

это не единственный лиганд, способный формировать состояние толерантности TLRs, поэтому далее в статье будет использован термин «индуцированная толерантность». Регуляция по принципу обратной отрицательной связи обеспечивает снижение выброса провоспалительных цитокинов, что необходимо для того, чтобы длительное или повторное воздействие лигандов TLRs не приводило к неконтролируемому или несоответствующему воспалению с последующим повреждением тканей [15, 16].

Таким образом, произошло расширение рецепторной теории толерантности TLRs до рецепторно-сигнальной. Однако со временем были обнаружены специфические для генов регуляторные механизмы, позволяющие модифицировать TLR-индуцированный клеточный ответ. В эксперименте длительное воздействие ЛПС приводило к различным изменениям хроматина, в связи с чем были выделены два класса генов: толерируемые и нетолерируемые. Это открытие дало начало новой теории формирования толерантности TLRs — эпигенетической [15]. Таким образом, индуцированная толерантность TLRs представляет собой глобальный сдвиг транскрипции от провоспалительного к противовоспалительному ответу при сохранении защитной функции врождённого иммунитета в кон-

тексте хронической или продолжающейся инфекции, но этот процесс не универсален и избирателен из-за большого разнообразия паттернов экспрессии цитокинов. Схема индуцированной толерантности TLRs представлена на **рис. 2**.

Закономерность заключается лишь в том, что, чем сильнее изначальная активация генов, тем эффективнее индуцированная толерантность [15–17]. При этом предполагается, что ответ клетки на стимуляцию TLRs реализуется по принципу «все или ничего», однако пороговое значение сигнала, необходимое для вовлечения компонентов сигнальных путей, является величиной непостоянной и регулируется SMOCs [7, 11, 18]. Например, анализ отдельных клеток после стимуляции TLRs различными дозами PAMPs продемонстрировал, что скорость индуцированной транслокации NF-κB в ядро не зависит от количества лиганда. Увеличение дозы лишь изменяет процент клеток, которые допускают транслокацию NF-κB [19].

Стоит отметить, что толерантность TLRs является обратимой. Модификация хроматина в толеризованных генах позволяет сохранить изменённую реакцию на повторную стимуляцию клеток, но эти изменения обратимы со временем или в ответ на конкурирующие сигналы [15, 20]. Примером обра-

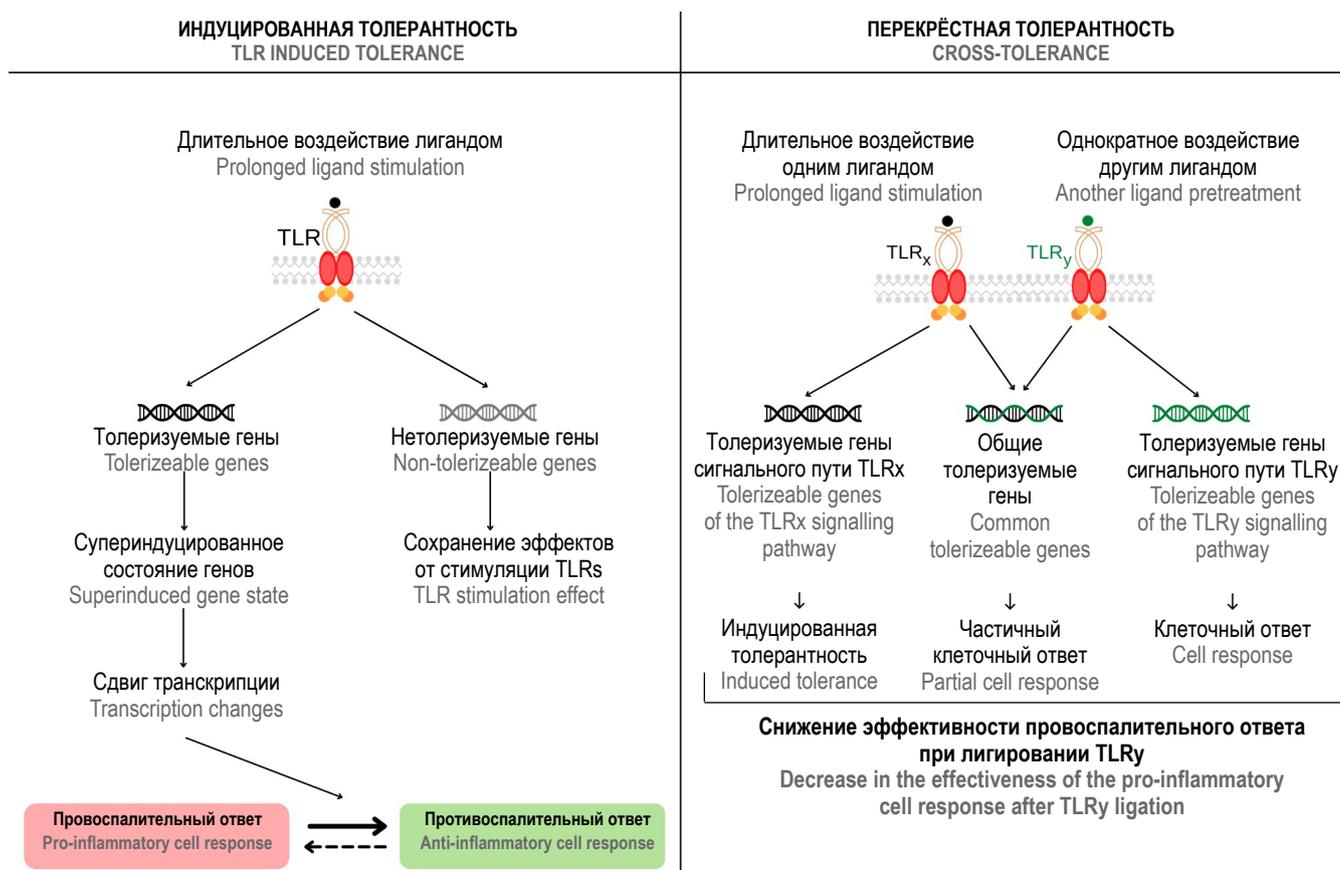


Рис. 2. Упрощённая схема формирования индуцированной и перекрестной толерантности TLRs.

Fig. 2. Simplified schematic diagram of induced and cross TLR tolerance.

тимости индуцированной толерантности являются исследования *in vivo* макрофагов мышей, толеризованных ЛПС. После обработки гранулоцитарно-макрофагальным колоннестимулирующим фактором или интерфероном- γ с последующей инъекцией второй дозы ЛПС у таких мышей наблюдалось частичное восстановление фактора некроза опухоли- α (ФНО- α) и интерлейкина (ИЛ) 10, но не до уровня контрольной группы [21].

При изучении компонентов сигнальных путей, связанных с разными TLRs, было открыто такое явление, как перекрёстная толерантность — феномен, при котором предварительное воздействие одного лиганда TLR индуцирует толерантность к воздействию лигандами на другие типы TLRs. При этом реализация этого вида толерантности возможна только между рецепторами, активация которых приводит к вовлечению одних и тех же начальных компонентов сигнальных путей [6, 22–24]. Схема формирования перекрёстной толерантности TLRs представлена на рис. 2.

В случае, если лигирование TLRs приводит к вовлечению разных адаптерных белков, но при этом в конечном итоге активируются одни и те же факторы транскрипции, можно наблюдать эффект, противоположный толерантности, — прайминг, т.е. усиление клеточного ответа. Такой феномен согласуется с идеей, что SMOCs могут регулировать пороговое значение сигнала [6, 23, 24].

Перекрёстная толерантность не обязательно бывает такой же эффективной, как толерантность, вызванная повторным воздействием на один тип TLRs, т.е. ауто толерантность. Например, клетки, обработанные сначала активируемым макрофагами липопептидом 2 — лигандом TLR2 (MALP-2), не отвечают на последующую стимуляцию ЛПС (лигандом TLR4), а клетки, предварительно обработанные ЛПС, не отвечают на стимуляцию липотейхоевой кислотой (лигандом TLR2) или флагеллином (лигандом TLR5). Однако предварительная обработка клеток липотейхоевой кислотой, ЛПС и CpG (лигандом TLR9) приводила к индуцированной ауто толерантности каждого TLRs к этим лигандам, но перекрёстную толерантность индуцировали именно липотейхоевая кислота и ЛПС, но не CpG. Эти данные указывают на то, что перекрёстная толерантность TLRs реализуется посредством разных механизмов [23].

Такой избирательный характер перекрёстной толерантности позволяет сохранить адекватный иммунный ответ на определённые патогены, особенно это имеет значение в контексте противовирусного иммунного ответа. Например, синтез ФНО- α ингибируется в макрофагах, толерантных ко всем тестируемым лигандам TLRs, однако синтез других цитокинов, таких как ИЛ-6, ингибируется в клетках, толерантных за счёт лигирования TLR4 и TLR3, а

синтез интерферона- β 1 — в клетках, толеризуемых лигандами TLR4 и TLR2. Отсутствие репрессии генов, отвечающих за синтез интерферона- β 1 в клетках, толеризуемых лигандом TLR3, может отражать важность интерферонов в противовирусном иммунном ответе. Точно так же синтез хемокинов CXCL9 и CXCL10 макрофагами с толеризованными TLR3 коррелирует с ролью этих факторов в привлечении CD8⁺-Т-клеток к участкам вирусной инфекции. Повторная стимуляция TLR9 или TLR2 толерантных клеток индуцирует экспрессию генов ИЛ-10 на уровнях, сравнимых со стимуляцией наивных макрофагов, а предварительная обработка клеток лигандами TLR4 и TLR3 приводит к снижению синтеза ИЛ-10 [16].

Ранее уже упоминалось, что основными теориями формирования толерантности TLRs являются рецепторно-сигнальная и эпигенетическая. Однако, в связи с большим объёмом новой информации о механизмах формирования толерантности TLRs, этот феномен уже не укладывается в рамки одной концепции, поэтому далее будут рассмотрены отдельные конкретные механизмы, о которых известно на сегодняшний день.

Регуляторные механизмы формирования толерантности TLRs на этапе доставки лиганда к рецептору

Для взаимодействия лиганда с некоторыми TLRs необходимы дополнительные компоненты. Соответственно, развитию толерантности способствует как дефицит этих компонентов, так и их избыток. При этом механизмы формирования толерантности будут различными. В первом случае активация компонентов сигнальных путей не происходит из-за нарушения образования рецепторного комплекса, во втором развивается индуцированная толерантность. Как было описано ранее, индуцированная толерантность TLRs напрямую связана с предшествующей активацией этих рецепторов и супериндуцированным состоянием генов [15–17]. Внеклеточный ЛПС-связывающий белок образует прямые контакты с бактериями и изменяет наружную мембрану таким образом, чтобы облегчить экстракцию ЛПС. ЛПС-связывающий белок переносит ЛПС на заякоренный и связанный с TLR4 ко-рецептор CD14. В активации TLR4 также участвуют молекулы MD-2. Таким образом, активный рецепторный комплекс состоит из ЛПС, TLR4, CD14 и MD-2, где CD14 усиливает эндоцитоз TLR4 [25–28]. В эксперименте с ИЛ-27, который стимулирует экспрессию TLR4 и продукцию растворимого CD14, было показано, что ИЛ-27 предотвращает развитие толерантности к ЛПС. Однако выявлено также, что повышенная базальная экспрессия связанного с мембраной CD14 может способствовать CD14-опосредованному эндоцитозу и отвечать за

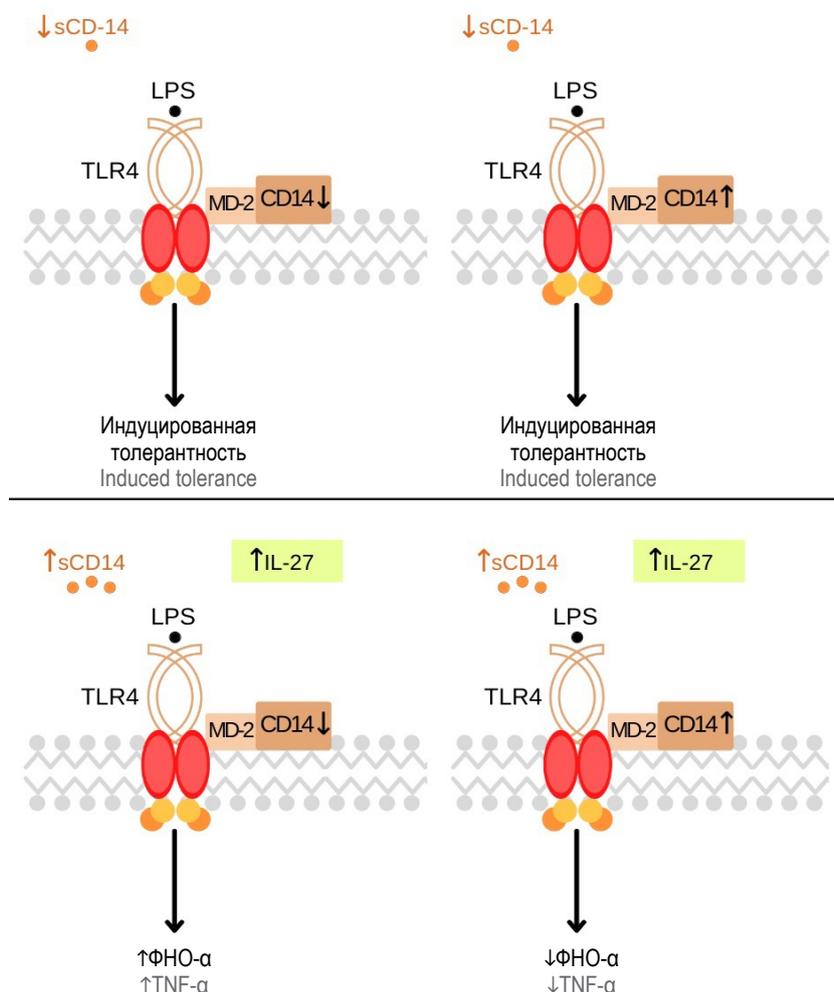


Рис. 3. ИЛ-27 повышает экспрессию растворимого CD14 (sCD14), что приводит к полному восстановлению чувствительности TLR4 к ЛПС на клетках с низким уровнем экспрессии мембранного CD14 (слева), вследствие чего наблюдается повышение синтеза ФНО- α . Клетки с высоким уровнем экспрессии мембранного CD14 (справа) сохраняют состояние ЛПС-индуцированной толерантности, несмотря на присутствие ИЛ-27, что проявляется низким уровнем продукции ФНО- α .

Fig. 3. IL-27 enhances the expression of soluble CD14 (sCD14), resulting in the completely recovered TLR4 sensitivity to LPS in the cells with a low expression level of membrane CD14 (on the left) and causing the increased production of TNF- α . The cells with high levels of membrane CD14 expression (on the right) retain a state of LPS-induced tolerance, despite the presence of IL-27, which is manifested in low production levels of TNF- α .

сохранение толерантности к ЛПС в присутствии ИЛ-27. Схема описанного эксперимента представлена на **рис. 3** [29].

Ещё одним примером является особенность эпителия кишечника. Эти клетки имеют апикальную, базальную и латеральную поверхности и экспрессируют TLRs. В то время как базолатеральная стимуляция TLR9 мобилизует воспалительный каскад, апикальная стимуляция TLR9 доставляет отрицательные сигналы, которые ограничивают воспалительные реакции на последующую базолатеральную стимуляцию TLRs (**рис. 4**). С одной стороны, это способствует поддержанию гомеостаза, а с другой — может являться одним из механизмов толерантности TLRs к представителям микробиоты кишечника [30, 31].

Регуляторные механизмы формирования толерантности TLRs на этапе взаимодействия лиганда с рецептором

К данным механизмам можно отнести взаимодействие TLRs с антагонистами и нарушение образования рецепторного комплекса. Здесь имеет значение не только тип рецептора, но и природа лиганда. Особое значение этот механизм регуляции имеет для TLR4. Во-первых, этот рецептор участвует как в MyD88-зависимом, так и в MyD88-независимом пути передачи, что означает различные конечные эффекты в результате их активации. Во-вторых, как указывалось выше, для активации MyD88-независимого пути через TLR4 необходимы также молекулы MD-2 и корецептор CD14 [32, 33]. Существуют микробные антагани-

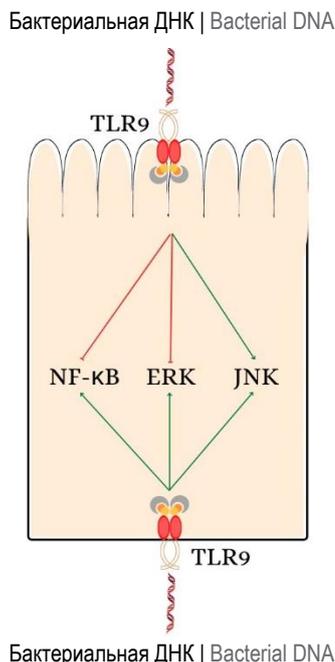


Рис. 4. Механизм подавления базолатеральной стимуляции TLR9 апикальной передачей сигналов TLR9.

Fig. 4. Mechanism of suppression of basolateral TLR9 stimulation by apical delivery of TLR9 signals.

сты TLR4, которые способны избирательно блокировать активацию поверхностного TLR4 благодаря длинным алифатическим цепям жирных кислот, которые попадают в полость связывания MD-2. К таким лигандам относятся ЛПС фотосинтезирующих бактерий *Rhodobacter sphaeroides*, обитающих на дне озёр, а также ЛПС цианобактерий. После введения этих антагонистов TLR4 или их синтетических аналогов последующее лигирование TLR4 ЛПС от *Escherichia coli* O111:B4 не приводило к активации внутриклеточных сигнальных путей. Таким образом, подобные антагонисты TLR4 уменьшают димеризацию комплексов TLR4–MD-2–агонист, тем самым предотвращая активацию TLR4, а также ингибируют нижестоящие внутриклеточные сигнальные пути [34].

Подобный механизм формирования толерантности существует и для TLR2. Стафилококковый суперантигенподобный протеин 3 (SSL3) окружает карман для связывания липопептидов на эктодомене TLR2, предотвращая доступ агонистов к полости рецептора, а также нарушает рекрутирование нижестоящего адаптерного белка благодаря ограничению конформационных изменений, возникающих уже после взаимодействия TLR2 с липопептидом [35].

В качестве ещё одного примера можно привести несколько исследований, раскрывающих механизмы формирования толерантности к представителям микробиоты. Комменсальные бактерии часто имеют изменённую структуру ЛПС, в связи

с чем он хуже распознаётся TLRs. Некоторые виды *Bacteroides* обычно содержат структуры пентаацилированного и монофосфорилированного липида А в качестве доминирующего компонента ЛПС. Эти структуры слабо активируют TLR4-зависимые воспалительные реакции. В соответствии с идеей, что минимизация передачи сигналов TLR4 является важным аспектом комменсализма, подавляющее большинство представителей *Bacteroides*, присутствующих в кишечнике человека, кодирует фермент LpxF, который отвечает за образование монофосфорилированного липида А [36, 37].

При изучении рассеянного склероза обнаружено, что концентрация L654 (лиганда TLR2), источником которого являются представители микробиоты, значительно понижена в крови у таких пациентов. В ходе дальнейшего изучения этого явления было выдвинуто предположение, что продукты, полученные от микробиоты, такие как L654, способны попадать в системный кровоток и вызывать состояние относительной толерантности TLRs. Таким образом, когда циркулирующие уровни компонентов микробиоты недостаточны, нормальная индукция толерантности TLRs может быть недостаточной, что приводит к более низкому порогу активации TLR2, в связи с чем большее количество клеток будет продуцировать провоспалительные цитокины. Это может способствовать развитию аутовоспалительных заболеваний, таких как рассеянный склероз [38, 39].

Регуляторные механизмы формирования толерантности TLRs на этапе образования SMOCs

События, происходящие в клетке после лигирования TLRs, видимо, гораздо сложнее, чем представлялось изначально. Каждый сигнальный путь связан с образованием SMOc. Предполагается, что эти структуры могут способствовать амплификации сигнала для достижения порогового значения и определять специфичность клеточных ответов. В передаче сигналов от TLRs участвуют две разновидности SMOc — миддосома (основным компонентом которой является белок MyD88) и триффосома (структура, центральным звеном которой является белок TRIF) [7, 10, 11, 17, 40].

Сборка миддосом вследствие активации TLR2, TLR4 и TLR9 происходит с участием адаптерного белка MAL, который обеспечивает взаимодействие с белком MyD88, в результате чего происходит рекрутирование в миддосому киназ семейства IRAK, а затем и TRAF6. Передача сигнала по MyD88-зависимому пути через остальные TLRs и сборка миддосом происходят аналогичным образом, но без участия адаптерного белка MAL, хотя внутриклеточные события, происходящие после лигирования некоторых рецепторов, ещё изучены недостаточно [7, 9, 11].

Триффосома образуется после активации TLR3, что рекрутирует адаптерный белок TRIF, а затем присоединяется убиквитинлигаза TRAF3 и активируется киназа TBK1 [9, 11, 34]. Активация TLR4 не всегда приводит к образованию триффосомы. По всей видимости, для реализации этого пути необходим эндоцитоз TLR4. Вероятно, этот процесс обеспечивает активный рецепторный комплекс, который состоит из TLR4, CD14 и MD-2, где CD14 как раз обеспечивает эндоцитоз TLR4. Адаптерный белок TRAM взаимодействует с TRIF, что приводит к рекрутированию в триффосому TRAF6 [7, 9, 11, 27–29, 34].

Некоторые патогенные микробы используют факторы вирулентности на основе белков, чтобы нарушать активацию внутриклеточных сигнальных путей, воздействуя на компоненты SMOCs. Ниже-описанные мишени обозначены на рис. 1. Например, всё большее количество бактерий и вирусов кодируют белки, содержащие TIR-домен, которые непродуктивным образом взаимодействуют с компонентами миддосомы. Механизмы, лежащие в основе этих непродуктивных взаимодействий, чётко не определены, но мутантные штаммы, у которых отсутствуют белки, содержащие TIR-домен, вызывают сильные воспалительные реакции и являются авирулентными [41–43].

Дополнительная стратегия, используемая патогенными микробами для подавления передачи сигналов TLRs, заключается в кодировании протеаз. В качестве примера можно привести вирусы гепатита С и Коксаки, которые кодируют протеазы, расщепляющие TRIF, что приводит к ингибированию передачи сигнала от TLR3 [7].

Поскольку разные TLRs задействуют разные комбинации адаптерных молекул, ответ на специфические агонисты TLRs отражает комбинацию ферментов и субстратов, которые рекрутируются на специфический рецептор/адаптерный комплекс. Некоторые патогенные бактерии и вирусы способны воздействовать сразу на несколько субстратов, в связи с чем сложно выделить отдельные эффекты и отследить их роль в формировании толерантности TLRs [7].

Для более детального изучения таких механизмов больше подходят модели с нокаутом определённых генов. Что касается триффосомы, в качестве примера можно привести мышей с нокаутом TRIF. Этот дефект проявляется нарушением индукции интерферона- β и активации IRF-3 в ответ на агонисты TLR3 и TLR4. Примером формирования индуцированной толерантности на уровне миддосомы являются белки, действующие как убиквитинлигаза (TRAF6), и непосредственно убиквитинлигазы E3 pellino-1 и -2, которые способны перекрывать активность TRAF6. Клетки, лишённые всех трёх этих ферментов, дефектны

в плане синтеза ИЛ-1. Клетки, лишённые только TRAF6, не являются дефектными для этих ответов. Кроме того, мутанты TRAF6, лишённые ферментативной активности, сохраняют способность опосредовать быстрые транскрипционные ответы, управляемые миддосомами, но эти ответы не могут быть устойчивыми [44, 45].

Таким образом, конкретные механизмы формирования толерантности на этапе образования SMOCs изучены недостаточно, но миддосомы и триффосомы могут быть потенциальными мишенями в развитии индуцированной толерантности с целью ухода патогенных микробов от иммунного ответа.

Регуляторные механизмы формирования толерантности TLRs за счёт воздействия на факторы транскрипции и репрессии генов

Многие исследования подтверждают важность NF- κ B в индукции воспалительных генов. Толерантность TLRs преимущественно обусловлена ауторегуляцией NF- κ B, при этом тип лиганда значения не имеет. Гены, репрессированные во время толерантности, в значительной степени связаны с NF- κ B-зависимой транскрипцией, в то время как мотивы IRF и B-ZIP избыточно представлены в промоторах генов, которые супериндуцированы в толерантных клетках. Вероятно, в этом и заключается ключевая роль фактора транскрипции NF- κ B в качестве активатора провоспалительных генов всех TLRs и индукции их толерантности [15, 17, 46, 47]. Например, белки вируса гепатита С способны подавлять ядерную транслокацию NF- κ B в дендритных клетках [48]. Индуцировать толерантность также возможно путём воздействия и на другие факторы транскрипции [7, 49].

Как уже упоминалось ранее, при развитии индуцированной толерантности уровень цитокинов и хемокинов снижался неоднородно, даже если уровень экспрессии их генов контролировался одними внутриклеточными механизмами. В связи с этим было выдвинуто предположение, что только часть генов способна репрессироваться в результате индуцированной толерантности TLRs. В пользу данной концепции свидетельствуют данные транскриптомного анализа, полученные после взаимодействия TLR4 с классическим лигандом — ЛПС. Обнаружены два класса генов: толеризируемые гены, которые репрессировались в процессе лигирования, и нетолеризируемые гены, которые не репрессировались [15, 50, 51]. Функциональная классификация ЛПС-индуцибельных генов показала, что провоспалительные факторы относятся преимущественно к классу толеризируемых генов, в то время как гены, кодирующие антимикробные факторы, включая антимикробные пептиды и рецепторы-мусорщики, попадают в класс нетолеризируемых [15].

Регуляторные механизмы формирования толерантности TLRs за счёт некодирующих РНК и модификации гистонов

В недавних исследованиях было выявлено, что некодирующие РНК (ncRNAs), такие как малые некодирующие молекулы РНК (miRs) и длинные некодирующие РНК (lncRNAs), могут модулировать иммунный ответ. Многие miRs активируются или ингибируются после взаимодействия TLRs с некоторыми лигандами. Эти miRs участвуют в регуляции сигнальных путей, воздействуя на MyD88, TRIF, IRAKs и TRAF6, а также на IRF3, NF- κ B и AP-1 [52]. Кроме того, секретлируемые miRs способны проникать в микробные клетки, что, в свою очередь, может приводить к изменениям состава микробиоты и иммунологической толерантности [53]. Известно, что экспрессия lncRNA повышается или понижается после взаимодействия лигандов с TLRs. Гены, кодирующие lncRNA, часто входят в число наиболее динамически регулируемых генов в TLR-активированных клетках и затем выступают в качестве положительных или отрицательных регуляторов этой активации [54].

Регуляторные механизмы формирования толерантности TLRs за счёт модификации гистонов также вызывают изменения в экспрессии генов во время толерантности к ЛПС [55, 56]. Исследования отдельных ЛПС-чувствительных генов предполагают, что промоторы генов также динамически регулируются, что приводит к толерантности. Например, триметилирование гистона H3K4, связанное с транскрипцией, индуцируется на промоторах в ответ на стимуляцию ЛПС. Однако во время толерантности триметилирование H3K4 больше не активируется на промоторах толеризируемых генов, например генов, отвечающих за синтез ИЛ-6, а скорее, индуцируется только на промоторах нетолеризируемых генов. Обработка паргилином, ингибитором H3K4-деметилазы, способна снова приводить к метилированию H3K4 на промоторе гена ИЛ-6 и снижать супрессию ИЛ-6 во время толерантности [55].

«Тренированный» врождённый иммунитет и индуцированная толерантность TLRs

Как было указано выше, индуцированная толерантность может быть обратимой, однако некоторые клетки способны сохранять «память», что наводит на мысль о том, что процессы формирования индуцированной толерантности могут иметь сходства с феноменом «тренированного» врождённого иммунитета. Косвенно об этом свидетельствуют данные, полученные при исследовании транскриптомных профилей макрофагов, вышедших из толерантного состояния. Они принимали гибридное состояние, т.е. сохраняли особенности M1 и M2 [7, 57–59].

Общность между механизмами толерантности и тренированным врождённым иммунитетом состоит в том, что оба, по-видимому, регулируются на уровне генов цитокинов, что косвенно подтверждается заметными модификациями гистонов. Однако остаётся неясным, как эти два феномена, отвечающие, по сути, за противоположные эффекты, связаны друг с другом, какие конкретные внутриклеточные события ассоциированы с тренированным врождённым иммунитетом, а какие — с индуцированной толерантностью. Причины, условия, метаболические изменения клетки, а также механизмы регуляции этих процессов нуждаются в дальнейшем изучении [15].

Заключение

В последние годы расширилось представление о молекулярных механизмах, связанных с сигнальными путями TLRs, тем не менее исследование этих рецепторов до сих пор является новой областью с большим потенциалом для клинического применения. На сегодняшний день достаточно большое количество препаратов, мишенью которых являются TLRs или нижестоящие компоненты сигнальных путей, проходят различные этапы клинических испытаний [38, 60–63].

Однако механизмы индуцированной и перекрёстной толерантности, а также феномен тренированного врождённого иммунитета ещё изучены недостаточно, чтобы быть уверенными в отсутствии нежелательных эффектов, которые могут проявиться со временем или при определённых условиях. Современные исследования толерантности TLRs освещают лишь отдельные фрагменты её регуляции. Для формирования более целостного представления сути данного процесса необходимы дальнейшие исследования.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Козлов В.А. Иммунная парадигма и иммуносупрессорная доминанта в патогенезе основных заболеваний современного человека. *Бюллетень Сибирской медицины*. 2019; 18(1): 7–17. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-7-17>
2. Burnett D.L., Reed J.H., Christ D., Goodnow C.C. Clonal redemption and clonal anergy as mechanisms to balance B cell tolerance and immunity. *Immunol. Rev.* 2019; 292(1): 61–75. <https://doi.org/10.1111/imr.12808>
3. Hodgkin P.D. Modifying clonal selection theory with a probabilistic cell. *Immunol. Rev.* 2018; 285(1): 249–62. <https://doi.org/10.1111/imr.12695>
4. Джафарова К.А., Джафаров Э.М. Роль микробиоты в иммунитете и воспалении. *Биомедицина (Баку)*. 2020; 18(3): 4–9. <https://doi.org/10.24411/1815-3917-2020-11811>
5. Belkaid Y., Harrison O.J. Homeostatic immunity and the microbiota. *Immunity*. 2017; 46(4): 562–76. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.04.008>
6. Николаева А.М., Максимчик П.В., Пашенков М.В. Сравнительная характеристика макрофагов, толерантных к агонистам рецепторов NOD1 и TLR4. *Иммунология*. 2021; 42(2): 102–11. <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-2-102-111>

7. Fitzgerald K.A., Kagan J.C. Toll-like receptors and the control of immunity. *Cell*. 2020; 180(6): 1044–66. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.041>
8. 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>
9. Kawai T., Akira S. TLR signaling. *Semin. Immunol.* 2007; 19(1): 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2006.12.004>
10. Gay N.J., Symmons M.F., Gangloff M., Bryant C.E. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nat. Rev. Immunol.* 2014; 14(8): 546–58. <https://doi.org/10.1038/nri3713>
11. Kagan J.C., Magupalli V.G., Wu H. SMOCs: supramolecular organizing centres that control innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2014; 14(12): 821–6. <https://doi.org/10.1038/nri3757>
12. Snyder M., Snyder G.A. Cobbling together the myddosome. *Structure*. 2020; 28(6): 598–600. <https://doi.org/10.1016/j.str.2020.05.006>
13. Vidya M.K., Kumar V.G., Sejian V., Bagath M., Krishnan G., Bhatta R. Toll-like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals. *Int. Rev. Immunol.* 2018; 37(1): 20–36. <https://doi.org/10.1080/08830185.2017.1380200>
14. Азбукина Н.В., Астахова А.А., Горяинов С.В., Чистяков В.В., Сергеева М.Г. Влияние высоко- и низкомолекулярной гиалуроновой кислоты на высвобождение омега-3 и омега-6 кислот при активации Толл-подобных рецепторов в астроцитах. *Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии*. 2020; 37(2): 94–102. <https://doi.org/10.31857/S0233475519060033>
15. Foster S.L., Hargreaves D.C., Medzhitov R. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature*. 2007; 447(7147): 972–8. <https://doi.org/10.1038/nature05836>
16. Butcher S.K., O'Carroll C.E., Wells C.A., Carmody R.J. Toll-like receptors drive specific patterns of tolerance and training on restimulation of macrophages. *Front. Immunol.* 2018; 9: 933. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00933>
17. DeFelice M.M., Clark H.R., Hughey J.J., Maayan I., Kudo T., Gutschow M.V., et al. NF- κ B signaling dynamics is controlled by a dose-sensing autoregulatory loop. *Sci. Signal.* 2019; 12(579): eaau3568. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aau3568>
18. Latty S.L., Sakai J., Hopkins L., Verstak B., Paramo T., Berglund N.A., et al. Activation of Toll-like receptors nucleates assembly of the MyDDosome signaling hub. *eLife*. 2018; 7: e31377. <https://doi.org/10.7554/eLife.31377>
19. Sung M.H., Li N., Lao Q., Gottschalk R.A., Hager G.L., Fraser I.D. Switching of the relative dominance between feedback mechanisms in lipopolysaccharide-induced NF- κ B signaling. *Sci. Signal.* 2014; 7(308): ra6. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004764>
20. Novakovic B., Habibi E., Wang S.Y., Arts R., Davar R., Megchelenbrink W., et al. β -Glucan reverses the epigenetic state of LPS-induced immunological tolerance. *Cell*. 2016; 167(5): 1354–68.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.034>
21. Bundschuh D.S., Barsig J., Hartung T., Randow F., Döcke W.D., Volk H.D., et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IFN- γ restore the systemic TNF- α response to endotoxin in lipopolysaccharide-desensitized mice. *J. Immunol.* 1997; 158(6): 2862–71.
22. Dobrovolskaia M.A., Medvedev A.E., Thomas K.E., Cuesta N., Toshchakov V., Ren T., et al. Induction of in vitro reprogramming by Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 agonists in murine macrophages: effects of TLR "homotolerance" versus "heterotolerance" on NF- κ B signaling pathway components. *J. Immunol.* 2003; 170(1): 508–19. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.1.508>
23. de Vos A.F., Pater J.M., van den Pangaart P.S., de Kruif M.D., van't Veer C., van der Poll T. *In vivo* lipopolysaccharide exposure of human blood leukocytes induces cross-tolerance to multiple TLR ligands. *J. Immunol.* 2009; 183(1): 533–42. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802189>
24. Bagchi A., Herrup E.A., Warren H.S., Trigilio J., Shin H.S., Valentine C., et al. MyD88-dependent and MyD88-independent pathways in synergy, priming, and tolerance between TLR agonists. *J. Immunol.* 2007; 178(2): 1164–71. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.2.1164>
25. Gioannini T.L., Teghanemt A., Zhang D., Coussens N.P., Dockstader W., Ramaswamy S., et al. Isolation of an endotoxin-MD-2 complex that produces Toll-like receptor 4-dependent cell activation at picomolar concentrations. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2004; 101(12): 4186–91. <https://doi.org/10.1073/pnas.0306906101>
26. Lizundia R., Sauter K.S., Taylor G., Werling D. Host species-specific usage of the TLR4-LPS receptor complex. *Innate Immun.* 2008; 14(4): 223–31. <https://doi.org/10.1177/1753425908095957>
27. Park B.S., Song D.H., Kim H.M., Choi B.S., Lee H., Lee J.O. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*. 2009; 458(7242): 1191–5. <https://doi.org/10.1038/nature07830>
28. Zaroni I., Ostuni R., Marek L.R., Barresi S., Barbalat R., Barton G.M., et al. CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. *Cell*. 2011; 147(4): 868–80. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.051>
29. Petes C., Mintsopoulos V., Finnen R.L., Banfield B.W., Gee K. The effects of CD14 and IL-27 on induction of endotoxin tolerance in human monocytes and macrophages. *J. Biol. Chem.* 2018; 293(45): 17631–45. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003501>
30. Lee J., Gonzales-Navajas J.M., Raz E. The "polarizing-tolerizing" mechanism of intestinal epithelium: its relevance to colonic homeostasis. *Semin. Immunopathol.* 2008; 30(1): 3–9. <https://doi.org/10.1007/s00281-007-0099-7>
31. Burgueño J.F., Abreu M.T. Epithelial Toll-like receptors and their role in gut homeostasis and disease. *Nature reviews. Gastroenterol. Hepatol.* 2020; 17(5): 263–78. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0261-4>
32. Tidswell M., Tillis W., Larosa S.P., Lynn M., Wittek A.E., Kao R., et al. Phase 2 trial of eritoran tetrasodium (E5564), a toll-like receptor 4 antagonist, in patients with severe sepsis. *Crit. Care Med.* 2010; 38(1): 72–83. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181b07b78>
33. Lucas K., Maes M. Role of the Toll Like receptor (TLR) radical cycle in chronic inflammation: possible treatments targeting the TLR4 pathway. *Mol. Neurobiol.* 2013; 48(1): 190–204. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8425-7>
34. Di Lorenzo F., De Castro C., Silipo A., Molinaro A. Lipopolysaccharide structures of Gram-negative populations in the gut microbiota and effects on host interactions. *FEMS Microbiol. Rev.* 2019; 43(3): 257–72. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz002>
35. Koymans K.J., Feitsma L.J., Bisschop A., Huizinga E.G., van Strijp J., de Haas C., et al. Molecular basis determining species specificity for TLR2 inhibition by staphylococcal superantigen-like protein 3 (SSL3). *Vet. Res.* 2018; 49(1): 115. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0609-8>
36. Cullen T.W., Schofield W.B., Barry N.A., Putnam E.E., Rundell E.A., Trent M.S., et al. Gut microbiota. Antimicrobial peptide resistance mediates resilience of prominent gut commensals during inflammation. *Science*. 2015; 347(6218): 170–5. <https://doi.org/10.1126/science.1260580>
37. Brown R.L., Larkinson M., Clarke T.B. Immunological design of commensal communities to treat intestinal infection and in-

- flammation. *PLoS Pathog.* 2021; 17(1): e1009191. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009191>
38. Anstadt E.J., Fujiwara M., Wasko N., Nichols F., Clark R.B. (2016). TLR tolerance as a treatment for central nervous system autoimmunity. *J. Immunol.* 2016; 197(6): 2110–8. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600876>
 39. Wasko N.J., Nichols F., Clark R.B. Multiple sclerosis, the microbiome, TLR2, and the hygiene hypothesis. *Autoimmun. Rev.* 2020; 19(1): 102430. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2019.102430>
 40. Motshwene P.G., Moncrieffe M.C., Grossmann J.G., Kao C., Ayaluru M., Sandercock A.M., et al. An oligomeric signaling platform formed by the Toll-like receptor signal transducers MyD88 and IRAK-4. *J. Biol. Chem.* 2009; 284(37): 25404–11. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.022392>
 41. Bowie A., Kiss-Toth E., Symons J.A., Smith G.L., Dower S.K., O'Neill L.A. A46R and A52R from vaccinia virus are antagonists of host IL-1 and toll-like receptor signaling. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2000; 97(18): 10162–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.160027697>
 42. Harte M.T., Haga I.R., Maloney G., Gray P., Reading P.C., Bartlett N.W., et al. The poxvirus protein A52R targets Toll-like receptor signaling complexes to suppress host defense. *J. Exp. Med.* 2003; 197(3): 343–51. <https://doi.org/10.1084/jem.20021652>
 43. Yu H., Bruneau R.C., Brennan G., Rothenburg S. Battle royale: innate recognition of poxviruses and viral immune evasion. *Bio-medicines.* 2021; 9(7): 765. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9070765>
 44. Moynagh P.N. The Pellino family: IRAK E3 ligases with emerging roles in innate immune signalling. *Trends Immunol.* 2009; 30(1): 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.10.001>
 45. Strickson S., Emmerich C.H., Goh E., Zhang J., Kelsall I.R., Macartney T., et al. Roles of the TRAF6 and Pellino E3 ligases in MyD88 and RANKL signaling. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2017; 114(17): E3481–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702367114>
 46. Carmody R.J., Ruan Q., Palmer S., Hilliard B., Chen Y.H. Negative regulation of toll-like receptor signaling by NF-kappaB p50 ubiquitination blockade. *Science.* 2007; 317(5838): 675–8. <https://doi.org/10.1126/science.1142953>
 47. Yan Q., Carmody R.J., Qu Z., Ruan Q., Jager J., Mullican S.E., et al. Nuclear factor-κB binding motifs specify Toll-like receptor-induced gene repression through an inducible repressosome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2012; 109(35): 14140–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1119842109>
 48. Черных Е.Р., Олейник Е.А., Леплина О.Ю., Старостина Н.М., Останин А.А. Дендритные клетки в патогенезе вирусного гепатита С. *Инфекция и иммунитет.* 2019; 9(2): 239–52. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2019-2-239-252>
 49. Song R., Gao Y., Dozmorov I., Malladi V., Saha I., McDaniel M.M., et al. IRF1 governs the differential interferon-stimulated gene responses in human monocytes and macrophages by regulating chromatin accessibility. *Cell Rep.* 2021; 34(12): 108891. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108891>
 50. Mages M.J., Dietrich H., Lang R. A genome-wide analysis of LPS tolerance in macrophages. *Immunobiology.* 2007; 212(9–10): 723–37. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2007.09.015>
 51. O'Carroll C., Fagan A., Shanahan F., Carmody R.J. (Identification of a unique hybrid macrophage-polarization state following recovery from lipopolysaccharide tolerance. *J. Immunol.* 2014; 192(1): 427–36. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301722>
 52. O'Neill L.A., Sheedy F.J., McCoy C.E. MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunology.* 2011; 11(3): 163–75. <https://doi.org/10.1038/nri2957>
 53. Hewel C., Kaiser J., Wierzeiko A., Linke J., Reinhardt C., Endres K., et al. Common miRNA patterns of Alzheimer's disease and Parkinson's disease and their putative impact on commensal gut microbiota. *Front. Neurosci.* 2019; 13: 113. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00113>
 54. Carpenter S., Aiello D., Atianand M.K., Ricci E.P., Gandhi P., Hall L.L., et al. A long noncoding RNA mediates both activation and repression of immune response genes. *Science.* 2013; 341(6147): 789–92. <https://doi.org/10.1126/science.1240925>
 55. Seeley J.J., Ghosh S. Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS. *J. Leukoc. Biol.* 2017; 101(1): 107–19. <https://doi.org/10.1189/jlb.3MR0316-118RR>
 56. Saeed S., Quintin J., Kerstens H.H., Rao N.A., Aghajani-fah A., Matarese F., et al. Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science.* 2014; 345(6204): 1251086. <https://doi.org/10.1126/science.1251086>
 57. O'Carroll C., Fagan A., Shanahan F., Carmody R.J. Identification of a unique hybrid macrophage-polarization state following recovery from lipopolysaccharide tolerance. *J. Immunol.* 2014; 192(1): 427–36. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301722>
 58. Fischer C., Metsger M., Bauch S., Vidal R., Bötcher M., Grote P., et al. Signals trigger state-specific transcriptional programs to support diversity and homeostasis in immune cells. *Sci. Signal.* 2019; 12(581): eaa05820. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aao5820>
 59. Arts R.J., Joosten L.A., Netea M.G. Immunometabolic circuits in trained immunity. *Semin. Immunol.* 2016; 28(5): 425–30. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.09.002>
 60. Gambuzza M.E., Sofo V., Salmeri F.M., Soraci L., Marino S., Bramanti P. Toll-like receptors in Alzheimer's disease: a therapeutic perspective. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 2014; 13(9): 1542–58. <https://doi.org/10.2174/1871527313666140806124850>
 61. Luchner M., Reinke S., Milicic A. TLR agonists as vaccine adjuvants targeting cancer and infectious diseases. *Pharmaceutics.* 2021; 13(2): 142. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020142>
 62. Anwar M.A., Shah M., Kim J., Choi S. Recent clinical trends in Toll-like receptor targeting therapeutics. *Med. Res. Rev.* 2019; 39(3): 1053–90. <https://doi.org/10.1002/med.21553>
 63. Vijay K. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future. *Int. Immunopharmacol.* 2018; 59: 391–412. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.03.002>

REFERENCES

1. Kozlov V.A. Immune paradigm and immunosuppressive dominance in the pathogenesis of major diseases of the modern man. *Byulleten' Sibirskoy meditsiny.* 2019; 18(1): 7–17. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-7-17> (in Russian)
2. Burnett D.L., Reed J.H., Christ D., Goodnow C.C. Clonal redemption and clonal anergy as mechanisms to balance B cell tolerance and immunity. *Immunol. Rev.* 2019; 292(1): 61–75. <https://doi.org/10.1111/imr.12808>
3. Hodgkin P.D. Modifying clonal selection theory with a probabilistic cell. *Immunol. Rev.* 2018; 285(1): 249–62. <https://doi.org/10.1111/imr.12695>
4. Dzhaferova K.A., Dzhaferov E.M. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Biomeditsina (Baku).* 2020; 18(3): 4–9. <https://doi.org/10.24411/1815-3917-2020-11811> (in Russian)
5. Belkaid Y., Harrison O.J. Homeostatic immunity and the microbiota. *Immunity.* 2017; 46(4): 562–76. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.04.008>
6. Nikolaeva A.M., Maksimchik P.V., Pashchenkov M.V. A comparative characterization of macrophages tolerant to NOD1 and TLR4 receptor agonists. *Immunologiya.* 2021; 42(2): 102–11. <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-2-102-111> (in Russian)

7. Fitzgerald K.A., Kagan J.C. Toll-like receptors and the control of immunity. *Cell*. 2020; 180(6): 1044–66. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.041>
8. 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>
9. Kawai T., Akira S. TLR signaling. *Semin. Immunol.* 2007; 19(1): 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2006.12.004>
10. Gay N.J., Symmons M.F., Gangloff M., Bryant C.E. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nat. Rev. Immunol.* 2014; 14(8): 546–58. <https://doi.org/10.1038/nri3713>
11. Kagan J.C., Magupalli V.G., Wu H. SMOCs: supramolecular organizing centres that control innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2014; 14(12): 821–6. <https://doi.org/10.1038/nri3757>
12. Snyder M., Snyder G.A. Cobbling together the myddosome. *Structure*. 2020; 28(6): 598–600. <https://doi.org/10.1016/j.str.2020.05.006>
13. Vidya M.K., Kumar V.G., Sejian V., Bagath M., Krishnan G., Bhatta R. Toll-like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals. *Int. Rev. Immunol.* 2018; 37(1): 20–36. <https://doi.org/10.1080/08830185.2017.1380200>
14. Azbukina N.V., Astakhova A.A., Goriyanov S.V., Chistyakov V.V., Sergeeva M.G. Effects of high and low molecular weight hyaluronic acids on the Omega-3 and Omega-6 fatty acid release upon activation of the Toll-like receptors in astrocytes. *Biologicheskie membrany: Zhurnal membrannoy i kletchnoy biologii.* 2020; 14(2): 126–33. <https://doi.org/10.1134/S1990747819060035>
15. Foster S.L., Hargreaves D.C., Medzhitov R. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature*. 2007; 447(7147): 972–8. <https://doi.org/10.1038/nature05836>
16. Butcher S.K., O'Carroll C.E., Wells C.A., Carmody R.J. Toll-like receptors drive specific patterns of tolerance and training on restimulation of macrophages. *Front. Immunol.* 2018; 9: 933. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00933>
17. DeFelice M.M., Clark H.R., Hughey J.J., Maayan I., Kudo T., Gutschow M.V., et al. NF- κ B signaling dynamics is controlled by a dose-sensing autoregulatory loop. *Sci. Signal.* 2019; 12(579): eaau3568. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aau3568>
18. Latty S.L., Sakai J., Hopkins L., Verstak B., Paramo T., Berglund N.A., et al. Activation of Toll-like receptors nucleates assembly of the MyDDosome signaling hub. *eLife*. 2018; 7: e31377. <https://doi.org/10.7554/eLife.31377>
19. Sung M.H., Li N., Lao Q., Gottschalk R.A., Hager G.L., Fraser I.D. Switching of the relative dominance between feedback mechanisms in lipopolysaccharide-induced NF- κ B signaling. *Sci. Signal.* 2014; 7(308): ra6. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004764>
20. Novakovic B., Habibi E., Wang S.Y., Arts R., Davar R., Megchelenbrink W., et al. β -Glucan reverses the epigenetic state of LPS-induced immunological tolerance. *Cell*. 2016; 167(5): 1354–68.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.034>
21. Bundschuh D.S., Barsig J., Hartung T., Randow F., Döcke W.D., Volk H.D., et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IFN-gamma restore the systemic TNF-alpha response to endotoxin in lipopolysaccharide-desensitized mice. *J. Immunol.* 1997; 158(6): 2862–71.
22. Dobrovolskaia M.A., Medvedev A.E., Thomas K.E., Cuesta N., Toshchakov V., Ren T., et al. Induction of in vitro reprogramming by Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 agonists in murine macrophages: effects of TLR "homotolerance" versus "heterotolerance" on NF-kappa B signaling pathway components. *J. Immunol.* 2003; 170(1): 508–19. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.1.508>
23. de Vos A.F., Pater J.M., van den Pangaart P.S., de Kruif M.D., van't Veer C., van der Poll T. In vivo lipopolysaccharide exposure of human blood leukocytes induces cross-tolerance to multiple TLR ligands. *J. Immunol.* 2009; 183(1): 533–42. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802189>
24. Bagchi A., Herrup E.A., Warren H.S., Trigilio J., Shin H.S., Valentine C., et al. MyD88-dependent and MyD88-independent pathways in synergy, priming, and tolerance between TLR agonists. *J. Immunol.* 2007; 178(2): 1164–71. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.2.1164>
25. Gioannini T.L., Teghanemt A., Zhang D., Coussens N.P., Dockstader W., Ramaswamy S., et al. Isolation of an endotoxin-MD-2 complex that produces Toll-like receptor 4-dependent cell activation at picomolar concentrations. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2004; 101(12): 4186–91. <https://doi.org/10.1073/pnas.0306906101>
26. Lizundia R., Sauter K.S., Taylor G., Werling D. Host species-specific usage of the TLR4-LPS receptor complex. *Innate Immun.* 2008; 14(4): 223–31. <https://doi.org/10.1177/1753425908095957>
27. Park B.S., Song D.H., Kim H.M., Choi B.S., Lee H., Lee J.O. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*. 2009; 458(7242): 1191–5. <https://doi.org/10.1038/nature07830>
28. Zanoni I., Ostuni R., Marek L.R., Barresi S., Barbalat R., Barton G.M., et al. CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. *Cell*. 2011; 147(4): 868–80. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.051>
29. Petes C., Mintsopoulos V., Finnen R.L., Banfield B.W., Gee K. The effects of CD14 and IL-27 on induction of endotoxin tolerance in human monocytes and macrophages. *J. Biol. Chem.* 2018; 293(45): 17631–45. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003501>
30. Lee J., Gonzales-Navajas J.M., Raz E. The "polarizing-tolerizing" mechanism of intestinal epithelium: its relevance to colonic homeostasis. *Semin. Immunopathol.* 2008; 30(1): 3–9. <https://doi.org/10.1007/s00281-007-0099-7>
31. Burgueño J.F., Abreu M.T. Epithelial Toll-like receptors and their role in gut homeostasis and disease. *Nature reviews. Gastroenterol. Hepatol.* 2020; 17(5): 263–78. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0261-4>
32. Tidswell M., Tillis W., Larosa S.P., Lynn M., Wittek A.E., Kao R., et al. Phase 2 trial of eritoran tetrasodium (E5564), a toll-like receptor 4 antagonist, in patients with severe sepsis. *Crit. Care Med.* 2010; 38(1): 72–83. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181b07b78>
33. Lucas K., Maes M. Role of the Toll Like receptor (TLR) radical cycle in chronic inflammation: possible treatments targeting the TLR4 pathway. *Mol. Neurobiol.* 2013; 48(1): 190–204. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8425-7>
34. Di Lorenzo F., De Castro C., Silipo A., Molinaro A. Lipopolysaccharide structures of Gram-negative populations in the gut microbiota and effects on host interactions. *FEMS Microbiol. Rev.* 2019; 43(3): 257–72. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz002>
35. Koymans K.J., Feitsma L.J., Bisschop A., Huizinga E.G., van Strijp J., de Haas C., et al. Molecular basis determining species specificity for TLR2 inhibition by staphylococcal superantigen-like protein 3 (SSL3). *Vet. Res.* 2018; 49(1): 115. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0609-8>
36. Cullen T.W., Schofield W.B., Barry N.A., Putnam E.E., Rundell E.A., Trent M.S., et al. Gut microbiota. Antimicrobial peptide resistance mediates resilience of prominent gut commensals during inflammation. *Science*. 2015; 347(6218): 170–5. <https://doi.org/10.1126/science.1260580>

37. Brown R.L., Larkinson M., Clarke T.B. Immunological design of commensal communities to treat intestinal infection and inflammation. *PLoS Pathog.* 2021; 17(1): e1009191. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009191>
38. Anstadt E.J., Fujiwara M., Wasko N., Nichols F., Clark R.B. (2016). TLR tolerance as a treatment for central nervous system autoimmunity. *J. Immunol.* 2016; 197(6): 2110–8. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600876>
39. Wasko N.J., Nichols F., Clark R.B. Multiple sclerosis, the microbiome, TLR2, and the hygiene hypothesis. *Autoimmun. Rev.* 2020; 19(1): 102430. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2019.102430>
40. Motshwene P.G., Moncrieffe M.C., Grossmann J.G., Kao C., Ayaluru M., Sandercock A.M., et al. An oligomeric signaling platform formed by the Toll-like receptor signal transducers MyD88 and IRAK-4. *J. Biol. Chem.* 2009; 284(37): 25404–11. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.022392>
41. Bowie A., Kiss-Toth E., Symons J.A., Smith G.L., Dower S.K., O'Neill L.A. A46R and A52R from vaccinia virus are antagonists of host IL-1 and toll-like receptor signaling. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2000; 97(18): 10162–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.160027697>
42. Harte M.T., Haga I.R., Maloney G., Gray P., Reading P.C., Bartlett N.W., et al. The poxvirus protein A52R targets Toll-like receptor signaling complexes to suppress host defense. *J. Exp. Med.* 2003; 197(3): 343–51. <https://doi.org/10.1084/jem.20021652>
43. Yu H., Bruneau R.C., Brennan G., Rothenburg S. Battle royale: innate recognition of poxviruses and viral immune evasion. *Biomedicines.* 2021; 9(7): 765. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9070765>
44. Moynagh P.N. The Pellino family: IRAK E3 ligases with emerging roles in innate immune signalling. *Trends Immunol.* 2009; 30(1): 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.10.001>
45. Strickson S., Emmerich C.H., Goh E., Zhang J., Kelsall I.R., Macartney T., et al. Roles of the TRAF6 and Pellino E3 ligases in MyD88 and RANKL signaling. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2017; 114(17): E3481–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702367114>
46. Carmody R.J., Ruan Q., Palmer S., Hilliard B., Chen Y.H. Negative regulation of toll-like receptor signaling by NF-kappaB p50 ubiquitination blockade. *Science.* 2007; 317(5838): 675–8. <https://doi.org/10.1126/science.1142953>
47. Yan Q., Carmody R.J., Qu Z., Ruan Q., Jager J., Mullican S.E., et al. Nuclear factor- κ B binding motifs specify Toll-like receptor-induced gene repression through an inducible repressosome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2012; 109(35): 14140–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1119842109>
48. Chernykh E.R., Oleynik E.A., Leplina O.Yu., Starostina N.M., Ostanin A.A. Dendritic cells in the pathogenesis of viral hepatitis C. *Infektsiya i immunitet.* 2019; 9(2): 239–52. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2019-2-239-252> (in Russian)
49. Song R., Gao Y., Dozmorov I., Malladi V., Saha I., McDaniel M.M., et al. IRF1 governs the differential interferon-stimulated gene responses in human monocytes and macrophages by regulating chromatin accessibility. *Cell Rep.* 2021; 34(12): 108891. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108891>
50. Mages M.J., Dietrich H., Lang R. A genome-wide analysis of LPS tolerance in macrophages. *Immunobiology.* 2007; 212(9–10): 723–37. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2007.09.015>
51. O'Carroll C., Fagan A., Shanahan F., Carmody R.J. (Identification of a unique hybrid macrophage-polarization state following recovery from lipopolysaccharide tolerance. *J. Immunol.* 2014; 192(1): 427–36. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301722>
52. O'Neill L.A., Sheedy F.J., McCoy C.E. MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunology.* 2011; 11(3): 163–75. <https://doi.org/10.1038/nri2957>
53. Hewel C., Kaiser J., Wierzeiko A., Linke J., Reinhardt C., Endres K., et al. Common miRNA patterns of Alzheimer's disease and Parkinson's disease and their putative impact on commensal gut microbiota. *Front. Neurosci.* 2019; 13: 113. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00113>
54. Carpenter S., Aiello D., Atianand M.K., Ricci E.P., Gandhi P., Hall L.L., et al. A long noncoding RNA mediates both activation and repression of immune response genes. *Science.* 2013; 341(6147): 789–92. <https://doi.org/10.1126/science.1240925>
55. Seeley J.J., Ghosh S. Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS. *J. Leukoc. Biol.* 2017; 101(1): 107–19. <https://doi.org/10.1189/jlb.3MR0316-118RR>
56. Saeed S., Quintin J., Kerstens H.H., Rao N.A., Aghajani-fah A., Matarese F., et al. Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science.* 2014; 345(6204): 1251086. <https://doi.org/10.1126/science.1251086>
57. O'Carroll C., Fagan A., Shanahan F., Carmody R.J. Identification of a unique hybrid macrophage-polarization state following recovery from lipopolysaccharide tolerance. *J. Immunol.* 2014; 192(1): 427–36. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301722>
58. Fischer C., Metsger M., Bauch S., Vidal R., Böttcher M., Grote P., et al. Signals trigger state-specific transcriptional programs to support diversity and homeostasis in immune cells. *Sci. Signal.* 2019; 12(581): eaao5820. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aao5820>
59. Arts R.J., Joosten L.A., Netea M.G. Immunometabolic circuits in trained immunity. *Semin. Immunol.* 2016; 28(5): 425–30. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.09.002>
60. Gambuzza M.E., Sofo V., Salmeri F.M., Soraci L., Marino S., Bramanti P. Toll-like receptors in Alzheimer's disease: a therapeutic perspective. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 2014; 13(9): 1542–58. <https://doi.org/10.2174/1871527313666140806124850>
61. Luchner M., Reinke S., Milicic A. TLR agonists as vaccine adjuvants targeting cancer and infectious diseases. *Pharmaceutics.* 2021; 13(2): 142. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020142>
62. Anwar M.A., Shah M., Kim J., Choi S. Recent clinical trends in Toll-like receptor targeting therapeutics. *Med. Res. Rev.* 2019; 39(3): 1053–90. <https://doi.org/10.1002/med.21553>
63. Vijay K. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future. *Int. Immunopharmacol.* 2018; 59: 391–412. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.03.002>

Информация об авторах

Булгакова Ирина Дмитриевна[✉] — м.н.с. лаб. молекулярной иммунологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия; аспирант и ассистент каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии ПМГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия, bulgakova_i_d@staff.sechenov.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2629-9616>

Свитич Оксана Анатольевна — д.м.н., член-корр. РАН, зав. лаб. молекулярной иммунологии, директор НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия; проф. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии ПМГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>

Зверев Виталий Васильевич — д.б.н., академик РАН, науч. рук. НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия; проф., зав. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии ПМГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0017-1892>

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

Статья поступила в редакцию 19.08.2022;
принята к публикации 01.11.2022;
опубликована 30.10.2022

Information about the authors

Irina D. Bulgakova[✉] — junior researcher, Laboratory of molecular immunology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia; postgraduate and assistant of the Microbiology, virology and immunology department of Sechenov University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2629-9616>

Oxana A. Svitich — D. Sci. (Med.), Corresponding member of RAS, Head, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia; Professor of Microbiology, virology and immunology department, Sechenov University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>

Vitaly V. Zverev — D. Sci. (Med.), Academician of RAS, Scientific head, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia; Professor, Head, Microbiology, virology and immunology department, Sechenov University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0017-1892>

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

The article was submitted 19.08.2022;
accepted for publication 01.11.2022;
published 30.10.2022

Научный обзор
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-270>



Роль кишечной микробиоты в регуляции иммунных реакций в иммунной системе кишечника в условиях стресса и при модуляции её состава путём введения антибиотиков и пробиотиков

Топол И.А.✉, Полякова И.С., Елыкова А.В.

Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

Аннотация

Интенсивное изучение в течение последних двух десятилетий микробной экосистемы желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) организма хозяина привело к тому, что кишечный микробиом был признан фундаментальным «игроком», который несет огромную иммунную нагрузку и отвечает как за течение физиологических процессов, так и за развитие патологических состояний человека и животных. Огромное количество бактерий, обитающих в ЖКТ человека, рассматривается как «функционирующий в диалоге орган» в формировании иммунологической толерантности, регуляции нормальной функциональной активности иммунной системы и поддержании гомеостаза слизистой оболочки кишечника. Нарушение взаимодействия между этими физиологическими системами тесно связано с патогенезом различных иммуноопосредованных заболеваний. В свою очередь, всё чаще хронический социальный стресс, наряду с приёмом антибиотиков, пре- и пробиотиков, признаётся одним из ведущих факторов, модулирующих состав микроорганизмов, обитающих в ЖКТ. Настоящий обзор посвящён изучению роли кишечного микробиома в регуляции иммунных реакций кишечного-ассоциированной лимфоидной ткани в условиях стресса и при модуляции её состава путём введения антибиотиков и пробиотиков.

Ключевые слова: обзор, хронический стресс, кишечная микробиота, антибиотики, пробиотики

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: Топол И.А., Полякова И.С., Елыкова А.В. Роль кишечной микробиоты в регуляции иммунных реакций в иммунной системе кишечника в условиях стресса и при модуляции её состава путём введения антибиотиков и пробиотиков. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(6):722–733. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-270>

Original article
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-270>

Role of intestinal microbiota in regulation of immune reactions of gut-associated lymphoid tissue under stress and following the modulation of its composition by antibiotics and probiotics administration

Inna A. Topol✉, Irina S. Polyakova, Anna V. Elykova

Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia

Abstract

Over the past two decades, active study of the microbial ecosystem of the host organism gastrointestinal tract has led to the recognition of gut microbiome as a "key player" that carries a significant immune pressure and is

responsible both for the course of physiological processes and for the development of pathological conditions in humans and animals. A vast number of bacteria living in the human gastrointestinal tract are considered as an “organ functioning in dialogue” in formation of immunological tolerance, the regulation of normal functional activity of the immune system and maintaining the intestinal mucosa homeostasis. However, disturbances in interaction between these physiological systems is closely related to the pathogenesis of different immune-mediated diseases. In turn, in a large number of works chronic social stress, along with the use of antibiotics, pre- and probiotics, is recognized as one of the leading factors modulating in the microbiota of the gastrointestinal tract. This review focuses on the role of the gut microbiome in the regulation of immune responses of GALT under stress and modulation of its composition by antibiotics and probiotics administration.

Keywords: *review, chronic stress, gut microbiota, antibiotics, probiotics*

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: Topol I.A., Polyakova I.S., Elykova A.V. Role of intestinal microbiota in regulation of immune reactions of gut-associated lymphoid tissue under stress and following the modulation of its composition by antibiotics and probiotics administration. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(6):722–733.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-270>

Актуальность темы

Согласно современным данным, микробиом кишечника представляет собой крупную симбиотическую экосистему, так называемый «микробный орган», который характеризуется генетической разнородностью и сложными скоординированными взаимоотношениями. Факторы, которые определяют структуру микробных сообществ в кишечнике, ещё мало изучены. Однако известно, что внутренние факторы (генетика организма хозяина и активность иммунной системы) и внешние факторы (антибиотики, пробиотики и рацион питания хозяина) играют важную роль в формировании структуры и функции этого микробного сообщества [1, 2]. За последнее десятилетие становится всё более очевидным тот факт, что кишечная микробиота имеет огромное значение в поддержании гомеостаза кишечника, регуляции нормальной функциональной активности иммунной системы слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) организма хозяина. Нарушение взаимодействия между этими физиологическими системами связано с патогенезом иммуноопосредованных заболеваний: пищевой аллергии, воспалительных заболеваний кишечника, аутоиммунных и метаболических расстройств и др., и это в очередной раз подчёркивает важность изучения функции микробиоты при таких заболеваниях.

Неотъемлемой частью современной жизни является социальный стресс. Даже в условиях мирного времени около 80% населения живёт в условиях хронического социального стресса (ХСС) высокого и среднего уровня [3]. Несмотря на то что стресс — это важный физиологический адаптационный механизм, связанный с возможностью организма скорректировать свой гомеостаз и, таким образом, минимизировать потенциальное воздействие угрозы, ХСС способен не только вызвать значительные нарушения в нейроэндокринной системе и приводить к психосоматическим проявлениям, таким как тре-

вога, депрессия, но и служить причиной изменений в функционировании врождённого и адаптивного иммунитета. Стресс-индуцированная иммунная дисрегуляция является триггером развития многих патологических состояний, включая аутоиммунные заболевания [4], воспалительные заболевания кишечника, например болезнь Крона и язвенный колит [5–7], инфекции [5] и опухоли [1, 8]. Кроме того, ХСС всё чаще признаётся одним из ведущих факторов, модулирующих состав микроорганизмов, обитающих в ЖКТ. В ряде исследований показано, что и сам ХСС, и применение антибиотиков на фоне ХСС резко изменяют состав кишечной микробиоты у людей и лабораторных животных [6, 7]. В свою очередь, кишечная микробиота является важным звеном в развитии патологического процесса при стрессе, тем самым выступая в качестве важного медиатора здоровья организма хозяина. Так, нарушения микробиоты кишечника были зарегистрированы у приматов с хроническим стрессом [9] и на моделях грызунов [10–13].

Цель настоящего обзора состоит в обобщении фактических данных о роли кишечной микробиоты в регуляции иммунных реакций кишечного-ассоциированной лимфоидной ткани (gut-associated lymphoid tissue — GALT) в условиях стресса и при модуляции её состава путём введения антибиотиков и пробиотиков. Работа выполнена на основе анализа публикаций, размещённых в электронных базах данных PubMed, Web of Science, Scopus. Глубина поиска составила 18 лет (2003–2021 гг.). Поиск публикаций проводился по следующим ключевым словам: «обзор», «хронический стресс», «кишечная микробиота», «антибиотики», «пробиотики», «иммунитет».

Основная часть

Самая большая коллекция лимфоидной ткани в организме — GALT — обеспечивает динамический

иммунологический барьер по всему ЖКТ. Изменения в функциональной активности иммунных клеток, эпителиальных клеток, секреции антимикробных пептидов и других интегральных медиаторов в пределах этого иммунологического барьера могут напрямую изменять состав и функции кишечной микробиоты [14–16].

Морфологически в GALT выделяют индуктивную (где происходит стимуляция антигенами «наивных» лимфоцитов) и эффекторную зоны (иммунный ответ, продукция секреторного иммуноглобулина А), образованные диффузно расположенными или организованными лимфоидными образованиями, часть из которых к тому же являются видоспецифичными. К первым образованиям относят интраэпителиальные лимфоциты и лимфоциты в собственной пластинке слизистой оболочки, ко вторым — компактно размещённые скопления лимфоцитов в виде сгруппированных лимфоидных узелков (пейеровы бляшки), изолированных лимфоидных узелков и заполненных лимфоцитами ворсинок. Пейеровы бляшки располагаются в тонком кишечнике, главным образом в стенках подвздошной кишки в собственной пластинке слизистой и в её подслизистой основе [17]. Они являются лимфоэпителиальными образованиями с участием специализированного фолликуло-ассоциированного эпителия с М-клетками [17]. Важными функциональными зонами пейеровых бляшек являются субэпителиальная зона (купол), где происходит непосредственная индукция иммунного ответа, процессинг антигенов, праймирование антиген-специфических Т- и В-лимфоцитов [17], и лимфатические фолликулы с герминативными центрами, в которых осуществляются соматические гипермутации и рекомбинации. Данные процессы обеспечивают переключение синтеза антител разных классов и созревание активированных В-лимфоцитов (**рисунок**).

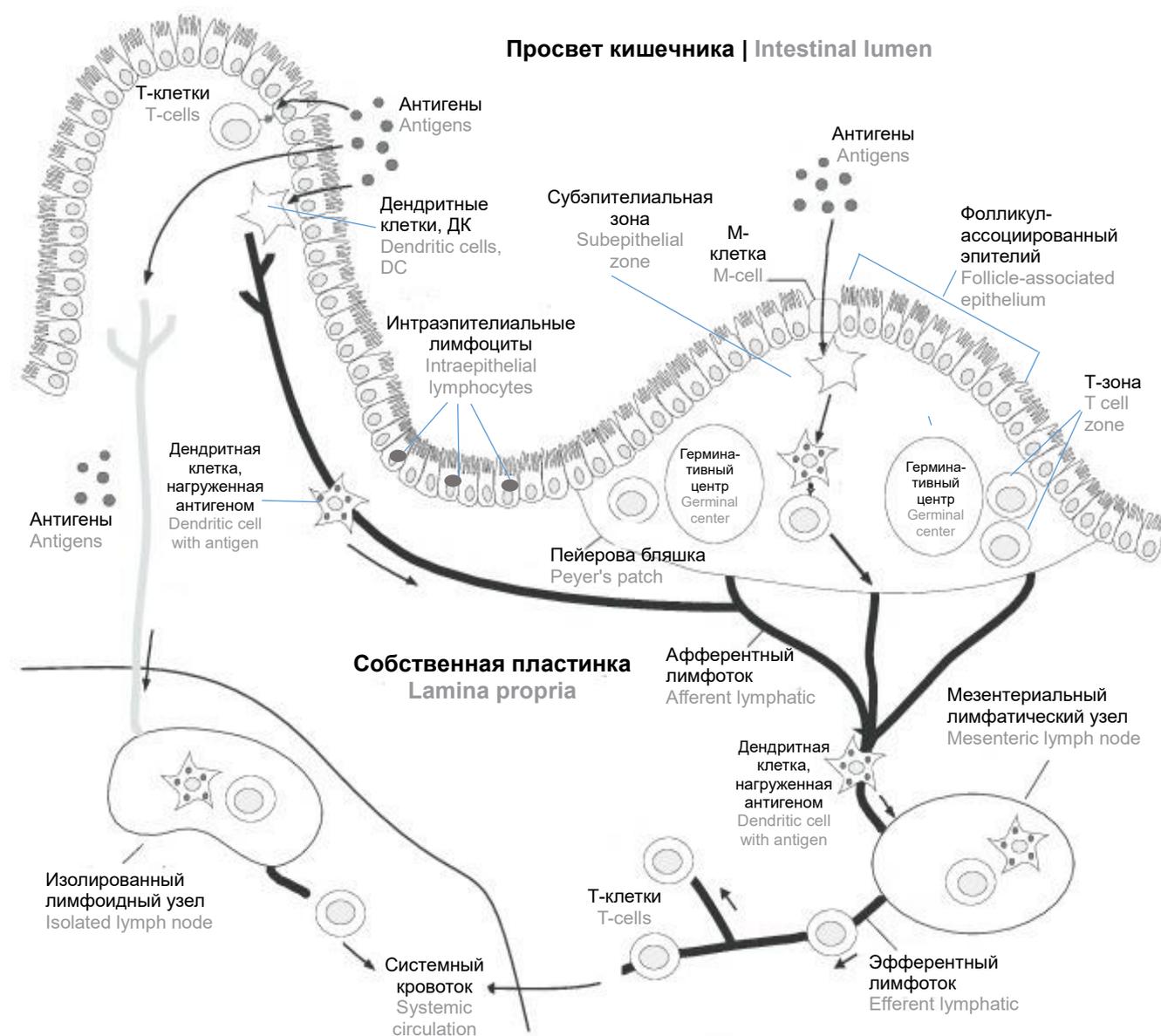
В свою очередь, микробная экосистема ЖКТ представляет собой иммунологически сложный и метаболически активный орган [18–21]. Выступая в качестве ключевого фактора влияния на GALT, кишечный микробиом, по разным оценкам, содержащий более 10^{14} бактериальных клеток как комменсальной, так и патогенной микрофлоры [14, 18], несёт огромную иммунную нагрузку на ЖКТ и рассматривается как «функционалирующий в диалоге орган» в формировании иммунологической толерантности и поддержании гомеостаза слизистой оболочки кишечника, особенно в условиях ХСС.

Врождённая иммунная система реагирует на повреждение клеток или патогенную транслокацию через паттерн-распознающие рецепторы, включающие трансмембранные Toll-подобные рецепторы (TLR), которые сканируют внешнюю среду кишечного просвета, внутриклеточные Nod-подобные рецепторы, «охраняющие» цитоплазматическое

пространство [22–25], и RIG-подобные рецепторы, имеющие решающее значение для адекватного противовирусного ответа и распознавания различных вирусов [24]. Эти паттерн-распознающие рецепторы способны специфически распознавать и связывать различные микробные макромолекулярные лиганды, так называемые патоген-ассоциированные молекулярные паттерны, и запрограммированы для обнаружения структур, высвобождаемых повреждёнными клетками. В свою очередь, микробы также могут распознавать иммунные регуляторы, такие как хемокины, провоспалительные и противовоспалительные цитокины, через паттерн-распознающие рецепторы, и эти регуляторы играют важную роль в аутоиммунном и адаптивном иммунитете [25]. Все классы паттерн-распознающих рецепторов широко экспрессируются клетками GALT и играют ключевую роль в развитии воспаления и инициации адаптивного звена иммунной системы.

Наиболее полно охарактеризовано взаимодействие рецепторного комплекса TLR2 и TLR4 с патоген-ассоциированными молекулярными паттернами [25–27]. TLR2 функционально связаны с цитоплазматической мембраной клетки и распознают патоген-ассоциированные молекулярные паттерны бактерий, грибов, вирусов и паразитов, которые имеют в своём составе липопроотеиды, липотейхоевые кислоты, пептидогликан, липоарабиноманан, зимозан, хитин, гемагглютинины, порины, гликоинозитол-фосфолипиды [26, 27]. TLR4 является первичным клеточным сенсором бактериального липополисахарида и ключевым медиатором адаптивного иммунного ответа на грамотрицательные бактерии [28–30]. Связывание лигандов с TLR2 и TLR4 инициирует каскад сигналов через ряд адаптерных молекул, прежде всего Myd88 (myeloid differentiation factor 88), а также активирует транскрипционные факторы: нуклеарный фактор κ B и интерферон-чувствительный фактор-3, инфламмасому NLRP3, регулирующие экспрессию провоспалительных цитокинов — интерлейкин (ИЛ)-1 β , ИЛ-6, ИЛ-18, фактор некроза опухоли (ФНО)- α и интерферонов (ИФН) [25, 29, 31]. TLR активно экспрессируются Т- и В-лимфоцитами [26], а изменения уровня их экспрессии в GALT в условиях стресса может напрямую влиять на дифференцировку Т- и В-лимфоцитов [29–31].

Развитие и функциональное состояние GALT зависит от состава кишечной микробиоты. Так, у гнотобиотических (GF, Germ-Free) животных нарушается морфогенез и наблюдаются значительные дефекты как врождённого, так и адаптивного звеньев иммунной системы, т.е. кишечная микробиота формирует GALT и регулирует дифференцировку отдельных субпопуляций Т-клеток: Т-хелперов (Th)-1, Th2, Th17, Т-регуляторных (Treg) [21]. Колонизация GF-мышей смесью комменсальной



Общий план-схема строения иммунной системы кишечника (GALT).
Schematic representation of the gut-associated lymphoid tissue (GALT).

Источник | Source: Zgair A., Chi Man Wong J., Gershkovich P. Targeting Immunomodulatory Agents to the Gut-Associated Lymphoid Tissue // Neuro-Immuno-Gastroenterology. Cham; 2016. P. 237–261. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-28609-9_14

микробиоты запускает генерацию Treg-клеток и ингибирует Th17-опосредованные иммунные ответы [21], и этот факт позволяет предположить, что микробиота играет жизненно важную роль в индукции Treg-клеток в кишечнике. В работах I. Ivanov и соавт. показано, что сегментарные нитевидные бактерии индуцируют в GALT ИЛ-23-опосредованную дифференцировку провоспалительных Th17- и Th1-клеток, а некоторые представители рода *Clostridium* (кластеры IV и XIVa) и полисахарид A *Bacteroides fragilis* стимулируют образование Treg-клеток и продукцию супрессорного цитокина ИЛ-10, который, в свою очередь, подавляет продукцию провоспалительных цитокинов

(ИЛ-17, ИЛ-23 и ФНО- α) [32]. Кроме того, моноколонизация GF-мышей *B. fragilis* модулировала патогенный/регуляторный T-клеточный баланс и, следовательно, защищала хозяина от индуцированного *Helicobacter hepaticus* воспаления кишечника. Микробиота кишечника также влияет на активацию и дифференцировку В-клеток. Эти процессы запускаются активацией ряда рецепторов, таких как рецептор В-клеток, CD40, TLR, NOD-подобных рецепторов, рецепторов цитокинов (например, ИЛ-21R) и/или рецепторов фактора активации В-клеток и индуцирующего пролиферацию лиганда (APRIL). С. Buchta и соавт. показано, что В-клетки экспрессируют TLR1, 2, 4, 6, 7 и 9 и активация этих TLR

увеличивает выживаемость В-клеток, презентацию антигена и выработку антител [33]. Интересно, что кишечная микробиота также увеличивает количество регуляторных В-клеток (Breg), обладающих противовоспалительными эффектами. Колонизация кишечной микробиоты индуцирует выработку ИЛ-1 β и ИЛ-6 дендритными клетками и эпителиальными клетками кишечника и, таким образом, способствует дифференцировке наивных В-клеток в Breg в брыжеечных лимфатических узлах [19]. Breg, в свою очередь, продуцируют ИЛ-10 для подавления провоспалительных субпопуляций Т-клеток. Таким образом, микробиота, помимо продукции антител, может оказывать различное влияние на В-клетки.

Биологическая важность изменений микробиоты, вызванных стрессом, недостаточно изучена. Тем не менее в ряде исследований показано, что повышение реактивности иммунной системы, вызванное социальным стрессом, зависит от микробиоты. М. Bailey и соавт. обнаружили, что ХСС значительно увеличивает уровни ИЛ-6 и моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 в крови и повышает реактивность макрофагов селезёнки на микробную стимуляцию, а также наблюдали тенденцию к снижению уровня *Lactobacillus* spp. и *Bacteroides* spp. в кишечнике [28]. Однако эти эффекты не проявлялись у GF-мышей или мышей, экспериментально получавших антибиотики для уменьшения микробиоты в кишечнике [1, 28]. Индуцированное ХСС увеличение бактерицидной активности макрофагов не происходило у IL-1R1^{-/-}-мышей [1, 2, 28]. Таким образом, изменения состава микрофлоры в условиях стресса способны как вызвать развитие воспалительных заболеваний, так и предупредить их развитие.

Кроме этого, ХСС активирует врождённую иммунную систему [27, 34–36], стимулирует продукцию провоспалительных цитокинов ИЛ-6/STAT3 и ФНО- α [37] и вызывает бактериальную транслокацию в GALT [27, 36]. Одним из возможных механизмов такого стимулирующего воздействия ХСС может быть активация адреналин/норадреналиновой (AI-3) системы, которая получила название «Quorum Sensing» (QS), что можно перевести как «чувство кворума» [38–40]. AI-3-активность была обнаружена у многих представителей интестинальной микробиоты — как у комменсальной (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*) [38, 40], так и у патогенной (*E. coli* O26: H11, *Shigella* sp., *Salmonella* sp.), что свидетельствует о вероятном участии этого медиатора в межвидовом «общении». Самым интригующим открытием стало обнаружение агонистических взаимодействий AI-3 QS-системы с адреналином и норадреналином человека [40, 41]. Данный факт позволяет предположить наличие у бактерий довольно специфических механизмов рецепции сигнальной информации организма хо-

зяина. Возможно, катехоламины, которые синтезируются в условиях ХСС, выступают в роли лигандов для рецепторов QS-системы AI-3 бактерий, воспринимаются как сигнал, свидетельствующий о достаточной для атаки плотности бактериальной популяции, и вызывают их транслокацию в GALT с гиперактивацией сначала врождённой, а затем адаптивной иммунной системы.

Недавно высказано предположение, что состав кишечной микробиоты может быть изменён путём введения бактерий, бактериальных субстратов или антимикробных препаратов, и вполне вероятно, что это может привести к значительной модуляции иммунной системы [42]. Среди наиболее часто применяемых препаратов в качестве таких потенциальных модуляторов микробного сообщества кишечника, влияющих на уровень иммунного ответа, являются антибиотики и пробиотики. Известно, что приём антибиотиков является фактором риска развития в дальнейшем воспалительных и аутоиммунных заболеваний, в частности сахарного диабета 1-го и 2-го типов, воспаления кишечника и др. [43–46]. Эффекты, вызванные применением антибиотиков, включают изменения состава бактериальных лигандов и производимых микробиотой метаболитов, потерю специфических бактериальных сигналов. Так, пероральное введение канамицина стимулирует Th2-поляризацию наивных лимфоцитов у мышей линии BALB/c и повышает у них риск развития аллергических заболеваний [47]. Аминогликозиды через изменения микробной композиции кишечника, прежде всего уменьшение количества комменсальной микрофлоры, также способны влиять на уровень экспрессии TLR2 и TLR4 [30], молекул основного комплекса гистосовместимости класса II [45], уменьшать продукцию антимикробных пептидов [42], влиять на уровень провоспалительных Th17-клеток [32]. Кроме того, недавно было обнаружено, что данный класс антибиотиков способен стимулировать образование новых М-клеток, которые расположены не в зоне фолликул-ассоциированного эпителия, а на поверхности кишечных ворсинок (так называемых ворсинчатых М-клеток) [48]. Появление новых М-клеток является процессом индуцибельным, и одним из таких индукторов их образования являются именно аминогликозиды. Недавние работы на мышах показали, что антибиотики приводят к увеличению количества свободной сиаловой кислоты в кишечнике, которая затем может быть использована условно-патогенными микроорганизмами (*Salmonella typhimurium* и *Clostridium difficile*) для усиления роста микробной колонии [45].

В свою очередь, пробиотики, в частности лактобактерии, путём экспрессии молекулярных эффекторов способны оказывать положительное влияние на GALT через ряд механизмов: колони-

зационную резистентность, усиление продукции муцина, антимикробных пептидов, супрессорных цитокинов, регулирование плотных контактов между эпителиоцитами и др. Лактобактерии производят метаболиты: триптофан-индол, индол-3-ацетат, триптамин [45, 49], которые являются лигандами арил-гидрокарбоновых рецепторов, экспрессирующихся на Th17-клетках, врождённых лимфоцитах, моноцитах, макрофагах и дендритных клетках [45]. Изменения содержания лактобактерий влияют на экспрессию клетками GALT фермента индоламин-2,3-диоксигеназы, который индуцирует катаболизм триптофана в проапоптотические метаболиты (например, кинуренин), а они, в свою очередь, способны подавлять активацию эффекторных Т-клеток. Обнаружена способность экспрессирующих индоламин-2,3-диоксигеназы клеток управлять дифференцированием наивных CD4⁺-Т-лимфоцитов в Foxp3⁺-iTreg-клетки, а также изучена их способность непосредственно активировать созревание Treg-клеток и предупреждать индуцированную воспалением их конверсию в провоспалительные субпопуляции Т-хелперов: Th17- и Th1-клетки [47, 49].

Ещё один метаболит кишечной микрофлоры — короткоцепочечные жирные кислоты (short-chain fatty acids — SCFA), которые считаются важными сигнальными молекулами в многочисленных физиологических и патологических процессах [50]. SCFA служат лигандами рецепторов свободных жирных кислот-2 (GPR43-рецепторы) и -3 (GPR41-рецепторы), экспрессируются клетками иммунной и нервной систем, а также в ЖКТ, в частности колоноцитами и энтероцитами тонкого и толстого кишечника. Факт вовлечения рецепторов свободных жирных кислот-2 в воспалительный процесс одновременно подтвердился двумя группами ученых, установивших вклад этих рецепторов в активацию иммунных клеток [50]. Так, описана роль SCFA в дифференцировке Т-клеток как в эффекторные, так и в Treg-лимфоциты [49, 51], а при воспалении SCFA будут способствовать дифференцировке наивных Т-клеток в Th1 и Th17 для усиления иммунного ответа. Кроме того, SCFA-сигналинг через регуляцию экспрессии ИЛ-10, ИЛ-18 способствует сдвигу Th1/Th17/Treg-клеток в сторону Treg-клеток посредством ингибирования гистоновых деацетилаз [51]. Эта функция также повышает экспрессию генов *XBP1*, *Aicda*, *Prdm1*, *AVPR1B* и *OXTR*, участвующих в дифференцировке В-клеток плазмы [19, 52, 53]. В иммунной системе рецепторы свободных жирных кислот-2 экспрессируются на эозинофилах, базофилах, нейтрофилах, моноцитах, дендритных и тучных клетках слизистых оболочек, что позволяет предположить важную роль SCFA в иммунных реакциях [54]. Так, SCFA могут косвенно регулировать В-лимфоциты, увеличивая выработку ИЛ-10 макрофагами и дендритными клетками по-

средством передачи сигналов SCFA-рецепторами или ингибирования гистоновых деацетилаз и, таким образом, способствовать выработке антител, особенно IgA [54, 55]. SCFA также активируют эпителиальные клетки кишечника через рецепторы GPR41 и GPR43, и эта активация делает эпителиальные клетки высокоэффективными в производстве медиаторов воспаления при активации TLR4 [54, 55].

Показано иммуномодулирующее действие *L. paracasei*, частично опосредованное секретиримой протеазой лактоцепином, которая избирательно деградирует ИФН- γ -индуцибельный белок-10, регулирующий иммунные ответы путём рекрутирования лейкоцитов и активирующий TLR4, Th1-клетки, естественные клетки-киллеры и моноциты/макрофаги [56, 57]. Лактобактерии оказывают антидиабетогенное действие в условиях стрептозотоцин-индуцированного диабета [42] и у BB-DP (BioBreeding diabetes prone) крыс за счёт индукции CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺-клеток [58, 59], уменьшают риск развития болезни Крона и язвенного колита [48]. Так, пробиотики *Bifidobacterium breve* и *L. rhamnosus* GG ингибируют активацию липополисахаридом экспрессии ИЛ-23 в клетках кишечника путём ингибирования ацетилирования гистонов и усиления метилирования ДНК [60, 61], играющего существенную роль в дифференцировке, пролиферации и выживании Th17. L. Chen и соавт. показали, что *L. acidophilus* ингибирует опосредованное количеством увеличение экспрессии ИЛ-6, ФНО- α и ИЛ-1b, а также подавляет колит-ассоциированный ответ ИЛ-23/Th17 в толстой кишке мыши [62]. Аналогично, пробиотический штамм *L. plantarum* TN8 снижал экспрессию провоспалительных цитокинов, регулировал иммунную систему кишечника крыс линии Вистар при тринитробензол-серноокислотном индуцированном колите [63].

Однако многие исследования по влиянию лактобактерий на иммунную систему лоббируются фирмами — производителями пробиотиков. Это подтверждается и некоторыми данными, которые свидетельствуют о возможности лактобактерий повышать риск развития аутоиммунных заболеваний, в частности ревматоидного артрита, экспериментального аутоиммунного энцефалита и др. [64–68]. Неконтролируемый приём пробиотиков способен оказывать иммуностимулирующее действие и быть одним из триггеров развития аутоиммунных заболеваний. Кроме того, лактобактерии способны влиять на количество основных регуляторов дифференцировки наивных Т-клеток в провоспалительные Th17-клетки — сегментарные нитевидные бактерии [32] и *Bacteroides fragilis*, которые стимулируют образование Treg-клеток и продукцию супрессорного цитокина ИЛ-10 [69], т.е. являются важными регуляторами баланса Th17/Treg в GALT.

S. Abdollahi-Roodsaz и соавт. продемонстрировали, что моноколонизация мышей с нокаутом антагониста рецептора ИЛ-1 ($IL1rn^{-/-}$), у которых спонтанно развивается аутоиммунный Т-клеточно-опосредованный артрит, комменсальной *L. bifidus* привела к быстрому началу заболевания, сравнимому по тяжести и частоте встречаемости с артритом, наблюдаемым у мышей без микробов. Артрит, вызванный *L. bifidus*, у этой модели обусловлен дисбалансом гомеостаза клеток Treg/Th17 и опосредован передачей сигналов TLR2/TLR4 [65]. В других работах показано, что пероральное введение лактобактерий экспериментальным животным может активировать экспрессию TLR2 и TLR4, снижать уровень Treg-клеток и увеличивать количество провоспалительных Th17- и Th1-клеток, а также ИЛ-12 [27]. Так, очищенный LTA *L. plantarum str. WCFS1*, *L. plantarum str. KCTC10887*, *L. casei str. YIT9029* и *L. fermentum str. YIT0159*, а также целые клетки *L. acidophilus str. NCFM* модулируют уровни ФНО- α через TLR2-зависимый механизм [61–63]. Согласно исследованиям Y. Chiba и соавт., в клетках селезёнки *L. casei* индуцировала продукцию ИЛ-12 клетками CD11b+ сильнее, чем патогенные грамположительные и грамотрицательные бактерии, и эффективно способствовала развитию Th1 с последующим высоким уровнем секреции ИФН- γ [66].

Кроме того, пробиотики способны изменять состав кишечной микрофлоры и таким образом влиять на Th1/Th2-баланс в GALT. В частности, приём *L. reuteri* меняет уровень экспрессии мРНК транскрипционных факторов Foxp3, GATA3 и Tbet в моноцитах крови новорождённых, снижает риск развития IgE-ассоциированной экземы [67]. *L. acidophilus La5* и *L. casei DN001* способны уменьшать уровень экспрессии Ror γ t и Tbet в моноцитах периферической крови взрослых людей, повышать экспрессию Foxp3, однако не влияют на уровень GATA3 и продукцию цитокинов ФНО- α и трансформирующего фактора роста- β [62, 68]. Y. Chiba и соавт. показали, что *L. rhamnosus CRL1505* повышает резистентность мышей линии BALB/c к респираторно-синцитиальным вирусам благодаря стимуляции генерации ИФН- γ -продуцирующих Th1-клеток и редукции Th2-ответа [66]. Способность увеличивать экспрессию цитокинов ИЛ-12 и ИФН- γ в пейеровых бляшках мышей была установлена для *L. plantarum 06CC2* [58]. Приём мышами *L. casei YIT9029*, *L. casei HY7201*, *L. brevis HY7401* или *L. plantarum HY20301* преимущественно увеличивал продукцию ИЛ-12 и ИФН- γ , снижая при этом уровень Th2-зависимых цитокинов ИЛ-4 и ИЛ-5 [59, 66]. Возможность *L. plantarum str. YU* активировать Th1-ответ и продукцию ИЛ-12 мышинными перитонеальными макрофагами, а также стимулировать активность естественных клеток-киллеров и продукцию IgA клетками селезёнки и пробиоти-

ками частично связывают с активацией TLR2 [69]. Анализ эффектов 7 видов лактобактерий на лимфоциты селезёнки показал их способность увеличивать баланс Th1/Th2-клеток в сторону Th1 из-за повышения соотношения секреции их цитокинов ИФН- γ /ИЛ-4. Y. Chiba и соавт. установили, что *L. casei* увеличивают продукцию ИЛ-12 клетками селезёнки и пейеровых бляшек мышей даже сильнее, чем некоторые патогенные бактерии, что, в свою очередь, стимулирует образование Th1-клеток и продукцию провоспалительного ИФН- γ [66]. Похожие данные были получены K. Shida и соавт., которые показали, что способность *L. casei* стимулировать дифференцировку Th1 связана с некоторыми полисахаридами их клеточной стенки, в частности PS-1 и PS-2 [59]. Данные эффекты сопровождаются незначительным снижением продукции ИЛ-17, не влияя при этом на количество Th17-клеток, а также не увеличивают плотность Foxp3⁺-Treg-клеток и продукцию ими супрессорных цитокинов ИЛ-10 и трансформирующий фактор роста- β . Таким образом, в данных исследованиях, несомненно, преобладают провоспалительные эффекты пробиотиков.

Выводы

Проведённый анализ данных литературы показал, что кишечная микробиота — это сложно организованная динамическая «живая» система, которая постоянно находится в тесном контакте с организмом хозяина, имеет огромное значение в поддержании гомеостаза кишечника и играет ключевую роль в регуляции иммунных реакций слизистых оболочек ЖКТ. В свою очередь, реакция GALT на модуляцию состава кишечной микрофлоры, несмотря на общий эффект по снижению активации ее врождённых и адаптивных компонентов, может в отдельных случаях свидетельствовать и об усилении уровня провоспалительной сигнализации.

Несмотря на огромное количество работ в данной области, необходимы дальнейшие исследования для определения связи между микробиомом и изменениями функционального состояния иммунных структур, ассоциированных со слизистыми оболочками ЖКТ, особенно в условиях ХСС. Это, в свою очередь, будет способствовать расширению существующих представлений о генетическом разнообразии кишечной микробиоты, её участии в развитии патологических состояний человека и, возможно, станет перспективным инструментом профилактики и лечения иммуноопосредованных заболеваний.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Mackos A.R., Maltz R., Bailey M.T. The role of the commensal microbiota in adaptive and maladaptive stressor-induced immunomodulation. *Horm. Behav.* 2017; 88: 70–8. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.10.006>

2. Mackos A.R., Varaljay V.A., Maltz R., Gur T.L., Bailey M.T. Role of the intestinal microbiota in host responses to stressor exposure. *Int. Rev. Neurobiol.* 2016; 131: 1–19. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2016.08.002>
3. Powell N. Psychosocial stress and inflammation in cancer. *Brain. Behav. Immun.* 2013; 30(Suppl.): 41–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.06.015>
4. Delévaux I. Stress and auto-immunity. *Rev. Med. Interne.* 2013; 34(8): 487–92. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2012.10.366>
5. Wei L., Li Y., Tang W., Sun Q., Chen L., Wang X., et al. Chronic unpredictable mild stress in rats induces colonic inflammation. *Front. Physiol.* 2019; 10: 1228. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01228>
6. Nishida A., Inoue R., Inatomi O., Bamba S., Naito Y., Andoh A. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clin. J. Gastroenterol.* 2018; 11(1): 1–10. <https://doi.org/10.1007/s12328-017-0813-5>
7. Reber S.O., Peters S., Slattery D.A., Hofmann C., Schölmerich J., Neumann I.D., et al. Mucosal immunosuppression and epithelial barrier defects are key events in murine psychosocial stress-induced colitis. *Brain Behav. Immun.* 2011; 25(6): 1153–61. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.03.004>
8. Aadra P.B., Matthew R.R., Scott J.B. The role of the microbiome in cancer development and therapy CA. *Cancer J. Clin.* 2017; 67(4): 326–44. <https://doi.org/10.3322/caac.21398>
9. Zheng P., Wu J., Zhang H., Perry S.W., Yin B., Tan X., et al. The gut microbiome modulates gut-brain axis glycerophospholipid metabolism in a region-specific manner in a nonhuman primate model of depression. *Mol. Psychiatry.* 2020; 26(6): 2380–92. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-0744-2>
10. Bharwani A., Mian M.F., Foster J.A., Surette M.G., Bienenstock J., Forsythe P. Structural & functional consequences of chronic psychosocial stress on the microbiome & host. *Psychoneuroendocrinology.* 2016; 63: 217–27. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.10.001>
11. Ding F., Wu J., Liu C., Bian Q., Qiu W., Ma Q., et al. Effect of Xiaoyaosan on colon morphology and intestinal permeability in rats with chronic unpredictable mild stress. *Front. Pharmacol.* 2020; 11: 1069. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01069>
12. González-Torres M.L., Dos Santos C.V. Uncontrollable chronic stress affects eating behavior in rats. *Stress.* 2019; 22(4): 501–8. <https://doi.org/10.1080/10253890.2019.1596079>
13. Gur T.L., Bailey M.T. Effects of stress on commensal microbes and immune system activity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016; 874: 289–300. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20215-0_14
14. Karl J.P., Hatch A.M., Arcidiacono S.M., Pearce S.C., Pantoja-Feliciano I.G., Doherty L.A., et al. Effects of psychological, environmental and physical stressors on the gut microbiota. *Front. Microbiol.* 2018; 9: 2013. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02013>
15. Molina-Torres G., Rodriguez-Arrastia M., Roman P., Sanchez-Labraca N., Cardona D. Stress and the Gut Microbiota-Brain axis. *Behav. Pharmacol.* 2019; 30(2 and 3 Spec. Issue): 187–200. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000478>
16. Salonen A., Lahti L., Salojärvi J., Holtrop G., Korpela K., Duncan S.H., et al. Impact of diet and individual variation on intestinal microbiota composition and fermentation products in obese men. *ISME J.* 2014; 8(11): 2218–30. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.63>
17. Jung C., Hugot J.P., Barreau F. Peyer's patches: the immune sensors of the intestine. *Int. J. Inflam.* 2010; 2010: 823710. <https://doi.org/10.4061/2010/823710>
18. Vitetta L., Coulson S., Linnane A.W., Butt H. The gastrointestinal microbiome and musculoskeletal diseases: a beneficial role for probiotics and prebiotics. *Pathogens.* 2013; 2(4): 606–26. <https://doi.org/10.3390/pathogens2040606>
19. Kim M., Kim C.H. Regulation of humoral immunity by gut microbial products. *Gut Microbes.* 2017; 8(4): 392–9. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1299311>
20. Kim C.H. Immune regulation by microbiome metabolites. *Immunology.* 2018; 154(2): 220–9. <https://doi.org/10.1111/imm.12930>
21. Zhao Q., Elson C.O. Adaptive immune education by gut microbiota antigens. *Immunology.* 2018; 154(1): 28–37. <https://doi.org/10.1111/imm.12896>
22. Claes A.K., Zhou J.Y., Philpott D.J. NOD-like receptors: guardians of intestinal mucosal barriers. *Physiology (Bethesda).* 2015; 30(3): 241–50. <https://doi.org/10.1152/physiol.00025.2014>
23. Sellge G., Kufer T.A. PRR-signaling pathways-learning from microbial tactics. *Semin. Immunol.* 2015; 27(2): 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2015.03.009>
24. Деген А.С., Камышный А.М. Экспрессия цитоплазматических NOD-2 и RIG-I рецепторов врожденного иммунитета в кишечнике крыс при экспериментальном сахарном диабете. *Российский иммунологический журнал.* 2014; 8(3): 525–8.
25. Shi N., Li N., Duan X., Niu H. Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. *Mil. Med. Res.* 2017; 4: 14. <https://doi.org/10.1186/s40779-017-0122-9>
26. Zanin-Zhorov A., Cohen I.R. Signaling via TLR2 and TLR4 directly down-regulates T cell effector functions: the regulatory face of danger signals. *Front. Immunol.* 2013; 4: 211. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00211>
27. Bailey M., Engler H., Powell N., Padgett D.A., Sheridan J.F. Repeated social defeat increases the bactericidal activity of splenic macrophages through a Toll-like receptor-dependent pathway. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2007; 293(3): 1180–90. <https://doi.org/10.1152/AJPREGU.00307.2007>
28. Bailey M., Dowd S., Galley J. Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: implications for stressor-induced immunomodulation. *Brain Behav. Immun.* 2011; 25: 397–407. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.10.023>
29. Kamdar K., Nguyen V., DePaolo R.W. Toll-like receptor signaling and regulation of intestinal immunity. *Virulence.* 2013; 4(3): 207–12. <https://doi.org/10.4161/viru.23354>
30. Liu G., Zhang L., Zhao Y. Modulation of immune responses through direct activation of Toll-like receptors to T cells. *Clin. Exp. Immunol.* 2010; 160(2): 168–75. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04091.x>
31. Yue Y., Chen Y., Liu H., Xu L., Zhou X., Ming H., et al. Shugan Hewei decoction alleviates cecum mucosal injury and improves depressive- and anxiety-like behaviors in chronic stress model rats by regulating cecal microbiota and inhibiting NLRP3 inflammasome. *Front. Pharmacol.* 2021; 12: 766474. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.766474>
32. Ivanov I.I., Atarashi K., Manel N., Brodie E.L., Shima T., Karaoz U., et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell.* 2009; 139(3): 485–98. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.033>
33. Buchta C.M., Bishop G.A. Toll-like receptors and B cells: functions and mechanisms. *Immunol. Res.* 2014; 59(1-3): 12–22. <https://doi.org/10.1007/s12026-014-8523-2>
34. Bailey M., Kierstein S., Sharma S., Spaitis M., Kinsey S.G., Tliba O., et al. Social stress enhances allergen-induced airway inflammation in mice and inhibits corticosteroid responsiveness of cytokine production. *J. Immunol.* 2009; 182(12): 7888–96. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0990062>
35. Powell N.D., Bailey M.T., Mays J.W., Stiner-Jones L.M., Hanke M.L., Padgett D.A., et al. Repeated social defeat activates dendritic cells and enhances Toll-like receptor dependent cytokine secretion. *Brain Behav. Immun.* 2009; 23(2): 225–31. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.09.010>
36. Bailey M.T., Dowd S.E., Parry N.M., Galley J.D., Schauer D.B., Lyte M. Stressor exposure disrupts commensal microbial populations in the intestines and leads to increased colonization by *Citrobacter rodentium*. *Infect. Immun.* 2010; 78(4): 1509–19. <https://doi.org/10.1128/IAI.00862-09>

37. Bartolomucci A. Social stress, immune functions and disease in rodents. *Front. Neuroendocrinol.* 2007; 28(1): 28–49. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2007.02.001>
38. Whiteley M., Diggle S.P., Greenberg E.P. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature.* 2017; 551(7680): 313–20. <https://doi.org/10.1038/nature24624>
39. Schwab M., Bergonzi C., Sakkos J., Staley C., Zhang Q., Sadowsky M.J., et al. Corrigendum: signal disruption leads to changes in bacterial community population. *Front. Microbiol.* 2021; 12: 691552. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.691552>
40. Sperandio V., Torres A., Jarvis B., Kaper J.B. Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2003; 100(15): 8951–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1537100100>
41. Wahlstrom A., Sayin S.I., Marschall H., Backhed F. Intestinal crosstalk between bile acids and microbiota and its impact on host metabolism. *Cell Metab.* 2016; 24(1): 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.05.005>
42. Gareau M.G., Sherman P.M., Walker W.A. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2010; 7(9): 503–14. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.117>
43. Bosco N., Noti M. The aging gut microbiome and its impact on host immunity. *Genes Immun.* 2021; 22(5–6): 289–303. <https://doi.org/10.1038/s41435-021-00126-8>
44. Francino M.P., Moya A. Effects of antibiotic use on the microbiota of the gut and associated alterations of immunity and metabolism. *EMJ Gastroenterol.* 2013; (1): 74–80. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01543>
45. Robinson C., Young V. Antibiotic administration alters the community structure of the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes.* 2010; (1): 279–84. <https://doi.org/10.4161/gmic.1.4.12614>
46. Willing B., Russell S., Finlay B. Shifting the balance: antibiotic effects on host — microbiota mutualism. *Nat. Rev. Microbiol.* 2011; 9(4): 233–43. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2536>
47. Sandra R.S., González Núñez L., García Del Barco Herrera D., Santos Febles E., Maza Ares D., Millares López R., et al. Role of epidermal growth factor and growth hormone-releasing peptide-6 in acceleration of renal tissue repair after kanamycin overdosing in rats. *Iran J. Kidney. Dis.* 2014; 8(5): 382–8.
48. Tahoun A., Mahajan S., Paxton E., Malterer G., Donaldson D.S., Wang D., et al. Salmonella transforms follicle-associated epithelial cells into M cells to promote intestinal invasion. *Cell Host Microbe.* 2012; 12(5): 645–56. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.10.009>
49. Zelante T., Iannitti R.G., Cunha C., De Luca A., Giovannini G., Pieraccini G., et al. Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity.* 2013; 39(2): 372–85. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.003>
50. Wu W., Sun M., Chen F., Cao A.T., Liu H., Zhao Y., et al. Microbiota metabolite short-chain fatty acid acetate promotes intestinal IgA response to microbiota, which is mediated by GPR43. *Mucosal Immunol.* 2017; 10(4): 946–56. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.114>
51. Park J., Kim M., Kang S.G., Jannasch A.H., Cooper B., Patterson J., et al. Short chain fatty acids induce both effector and regulatory T cells by suppression of histone deacetylases and regulation of the mTORS6K pathway. *Mucosal Immunol.* 2015; 8(1): 80–93. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.44>
52. Kazantseva A.V., Davydova Y.D., Enikeeva R.F., Valinurov R.G., Gareeva A.E., Khusnutdinova N.N., et al. The association study of polymorphic variants of hypothalamic-pituitary-adrenal system genes (AVPR1B, OXTR) and aggressive behavior manifestation: a focus on social environment. *Res. Results Biomed.* 2021; 7(3): 232–44. <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2021-7-3-0-3>
53. Shi L.Z., Wang R., Huang G., Vogel P., Neale G., Green D.R., et al. HIF1alpha-dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. *J. Exp. Med.* 2011; 208(7): 1367–76. <https://doi.org/10.1084/jem.20110278>
54. Chang P.V., Hao L., Offermanns S., Medzhitov R. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2014; 111(6): 2247–52. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322269111>
55. Singh N., Gurav A., Sivaprakasam S., Brady E., Padiá R., Shi H., et al. Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity.* 2014; 40(1): 128–39. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.12.007>
56. Lee E.Y., Lee Z.H., Song Y.W. CXCL10 and autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* 2009; 8(5): 379–83. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2008.12.002>
57. Авдеева А.С. ИФН γ -индуцируемый белок 10 (IP-10) при ревматоидном артрите: обзор литературы и собственные данные. *Научно-практическая ревматология.* 2017; 55(6): 655–61. <https://doi.org/10.14412/1995-4484-2017-655-661>
58. Round J.L., Mazmanian S.K. Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *PNAS.* 2010; 107(27): 12204–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909122107>
59. Shida K., Nanno M., Nagata S. Flexible cytokine production by macrophages and T cells in response to probiotic bacteria: a possible mechanism by which probiotics exert multifunctional immune regulatory activities. *Gut Microbes.* 2011; 2(2): 109–14. <https://doi.org/10.4161/gmic.2.2.15661>
60. Verma R., Lee C., Jeun E., Yi J., Kim K.S., Ghosh A., et al. Cell surface polysaccharides of Bifidobacterium bifidum induce the generation of Foxp3(+) regulatory T cells. *Sci. Immunol.* 2018; 3(28): eaat6975. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aat6975>
61. Ghadimi D., Helwig U., Schrezenmeir J., Heller K.J., de Vrese M. Epigenetic imprinting by commensal probiotics inhibits the IL-23/IL-17 axis in an in vitro model of the intestinal mucosal immune system. *J. Leukocyte Biol.* 2012; 92(4): 895–911. <https://doi.org/10.1189/jlb.0611286>
62. Chen L., Zou Y., Peng J., Lu F., Yin Y., Li F., et al. Lactobacillus acidophilus suppresses colitis-associated activation of the IL-23/Th17 axis. *J. Immunol. Res.* 2015; 2015: 909514. <https://doi.org/10.1155/2015/909514>
63. Trabelsi I., Ktari N., Ben Slima S., Hamden K., Ben Salah R. Effect of the probiotic strain Lactobacillus plantarum TN8 on trinitrobenzenesulfonic acid induced colitis in rats. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.).* 2017; 101(2): 311–19. <https://doi.org/10.1111/jpn.12536>
64. Azad A.K., Sarker M., Li T., Yin J. Probiotic species in the modulation of gut microbiota: an overview. *Biomed. Res. Int.* 2018; 2018: 9478630. <https://doi.org/10.1155/2018/9478630>
65. Abdollahi-Roodsaz S., Joosten L.A., Koenders M.I., Devesa I., Roelofs M.F., Radstake T.R., et al. Stimulation of TLR2 and TLR4 differentially skews the balance of T cells in a mouse model of arthritis. *J. Clin. Invest.* 2008; 118(1): 205–16. <https://doi.org/10.1172/JCI32639>
66. Chiba Y., Shida K., Nagata S. Well-controlled pro-inflammatory cytokine responses of Peyer's patch cells to probiotic Lactobacillus casei. *Immunol.* 2010; 130(3): 352–62. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03204.x>
67. Liu Y., Fatheree N., Mangalat N. Lactobacillus reuteri strains reduce incidence and severity of experimental necrotizing enterocolitis via modulation of TLR4 and NF- κ B signaling in the intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2012; 15: 608–17. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00266.2011>
68. Zarrati M., Shidfar F., Nourijelyani K. Lactobacillus acidophilus La5, Bifidobacterium BB12, and Lactobacillus casei DN001 modulate gene expression of subset specific transcription fac-

- tors and cytokines in peripheral blood mononuclear cells of obese and overweight people. *Biofactors*. 2013; 39(6): 633–43. <https://doi.org/10.1002/biof.1128>
69. Shimazu T., Villena J., Tohno M., Fujie H., Hosoya S., Shimamoto T., et al. Immunobiotic *Lactobacillus jensenii* elicits anti-inflammatory activity in porcine intestinal epithelial cells by modulating negative regulators of the Toll-like receptor signaling pathway. *Infect. Immun.* 2012; 80(1): 276–88. <https://doi.org/10.1128/IAI.05729-11>
- REFERENCES
1. Mackos A.R., Maltz R., Bailey M.T. The role of the commensal microbiota in adaptive and maladaptive stressor-induced immunomodulation. *Horm. Behav.* 2017; 88: 70–8. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.10.006>
 2. Mackos A.R., Varaljay V.A., Maltz R., Gur T.L., Bailey M.T. Role of the intestinal microbiota in host responses to stressor exposure. *Int. Rev. Neurobiol.* 2016; 131: 1–19. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2016.08.002>
 3. Powell N. Psychosocial stress and inflammation in cancer. *Brain. Behav. Immun.* 2013; 30(Suppl.): 41–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.06.015>
 4. Delévaux I. Stress and auto-immunity. *Rev. Med. Interne.* 2013; 34(8): 487–92. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2012.10.366>
 5. Wei L., Li Y., Tang W., Sun Q., Chen L., Wang X., et al. Chronic unpredictable mild stress in rats induces colonic inflammation. *Front. Physiol.* 2019; 10: 1228. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01228>
 6. Nishida A., Inoue R., Inatomi O., Bamba S., Naito Y., Andoh A. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clin. J. Gastroenterol.* 2018; 11(1): 1–10. <https://doi.org/10.1007/s12328-017-0813-5>
 7. Reber S.O., Peters S., Slattery D.A., Hofmann C., Schölmerich J., Neumann I.D., et al. Mucosal immunosuppression and epithelial barrier defects are key events in murine psychosocial stress-induced colitis. *Brain Behav. Immun.* 2011; 25(6): 1153–61. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.03.004>
 8. Aadra P.B., Matthew R.R., Scott J.B. The role of the microbiome in cancer development and therapy CA. *Cancer J. Clin.* 2017; 67(4): 326–44. <https://doi.org/10.3322/caac.21398>
 9. Zheng P., Wu J., Zhang H., Perry S.W., Yin B., Tan X., et al. The gut microbiome modulates gut-brain axis glycerophospholipid metabolism in a region-specific manner in a nonhuman primate model of depression. *Mol. Psychiatry.* 2020; 26(6): 2380–92. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-0744-2>
 10. Bharwani A., Mian M.F., Foster J.A., Surette M.G., Bienenstock J., Forsythe P. Structural & functional consequences of chronic psychosocial stress on the microbiome & host. *Psychoneuroendocrinology.* 2016; 63: 217–27. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.10.001>
 11. Ding F., Wu J., Liu C., Bian Q., Qiu W., Ma Q., et al. Effect of Xiaoyaosan on colon morphology and intestinal permeability in rats with chronic unpredictable mild stress. *Front. Pharmacol.* 2020; 11: 1069. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01069>
 12. González-Torres M.L., Dos Santos C.V. Uncontrollable chronic stress affects eating behavior in rats. *Stress.* 2019; 22(4): 501–8. <https://doi.org/10.1080/10253890.2019.1596079>
 13. Gur T.L., Bailey M.T. Effects of stress on commensal microbes and immune system activity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016; 874: 289–300. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20215-0_14
 14. Karl J.P., Hatch A.M., Arcidiacono S.M., Pearce S.C., Pantolja-Feliciano I.G., Doherty L.A., et al. Effects of psychological, environmental and physical stressors on the gut microbiota. *Front. Microbiol.* 2018; 9: 2013. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02013>
 15. Molina-Torres G., Rodríguez-Arrastia M., Roman P., Sanchez-Labraca N., Cardona D. Stress and the Gut Microbiota-Brain axis. *Behav. Pharmacol.* 2019; 30(2 and 3 Spec. Issue): 187–200. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000478>
 16. Salonen A., Lahti L., Salojärvi J., Holtrop G., Korpela K., Duncan S.H., et al. Impact of diet and individual variation on intestinal microbiota composition and fermentation products in obese men. *ISME J.* 2014; 8(11): 2218–30. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.63>
 17. Jung C., Hugot J.P., Barreau F. Peyer's patches: the immune sensors of the intestine. *Int. J. Inflam.* 2010; 2010: 823710. <https://doi.org/10.4061/2010/823710>
 18. Vitetta L., Coulson S., Linnane A.W., Butt H. The gastrointestinal microbiome and musculoskeletal diseases: a beneficial role for probiotics and prebiotics. *Pathogens.* 2013; 2(4): 606–26. <https://doi.org/10.3390/pathogens2040606>
 19. Kim M., Kim C.H. Regulation of humoral immunity by gut microbial products. *Gut Microbes.* 2017; 8(4): 392–9. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1299311>
 20. Kim C.H. Immune regulation by microbiome metabolites. *Immunology.* 2018; 154(2): 220–9. <https://doi.org/10.1111/imm.12930>
 21. Zhao Q., Elson C.O. Adaptive immune education by gut microbiota antigens. *Immunology.* 2018; 154(1): 28–37. <https://doi.org/10.1111/imm.12896>
 22. Claes A.K., Zhou J.Y., Philpott D.J. NOD-like receptors: guardians of intestinal mucosal barriers. *Physiology (Bethesda).* 2015; 30(3): 241–50. <https://doi.org/10.1152/physiol.00025.2014>
 23. Sellge G., Kufer T.A. PRR-signaling pathways-learning from microbial tactics. *Semin. Immunol.* 2015; 27(2): 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2015.03.009>
 24. Degen A.S., Kamyshnyy A.M. Expression of cytoplasmic NOD-2 and RIG-I receptors of innate immunity in intestine of rats in experimental diabetes mellitus. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal.* 2014; 8(3): 525–8. (in Russian)
 25. Shi N., Li N., Duan X., Niu H. Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. *Mil. Med. Res.* 2017; 4: 14. <https://doi.org/10.1186/s40779-017-0122-9>
 26. Zanin-Zhorov A., Cohen I.R. Signaling via TLR2 and TLR4 directly down-regulates T cell effector functions: the regulatory face of danger signals. *Front. Immunol.* 2013; 4: 211. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00211>
 27. Bailey M., Engler H., Powell N., Padgett D.A., Sheridan J.F. Repeated social defeat increases the bactericidal activity of splenic macrophages through a Toll-like receptor-dependent pathway. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2007; 293(3): 1180–90. <https://doi.org/10.1152/AJPREGU.00307.2007>
 28. Bailey M., Dowd S., Galley J. Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: implications for stressor-induced immunomodulation. *Brain Behav. Immun.* 2011; 25: 397–407. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.10.023>
 29. Kamdar K., Nguyen V., DePaolo R.W. Toll-like receptor signaling and regulation of intestinal immunity. *Virulence.* 2013; 4(3): 207–12. <https://doi.org/10.4161/viru.23354>
 30. Liu G., Zhang L., Zhao Y. Modulation of immune responses through direct activation of Toll-like receptors to T cells. *Clin. Exp. Immunol.* 2010; 160(2): 168–75. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04091.x>
 31. Yue Y., Chen Y., Liu H., Xu L., Zhou X., Ming H., et al. Shugan Hewei decoction alleviates cecum mucosal injury and improves depressive- and anxiety-like behaviors in chronic stress model rats by regulating cecal microbiota and inhibiting NLRP3 inflammasome. *Front. Pharmacol.* 2021; 12: 766474. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.766474>
 32. Ivanov I.I., Atarashi K., Manel N., Brodie E.L., Shima T., Karaoz U., et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell.* 2009; 139(3): 485–98. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.033>

33. Buchta C.M., Bishop G.A. Toll-like receptors and B cells: functions and mechanisms. *Immunol. Res.* 2014; 59(1-3): 12–22. <https://doi.org/10.1007/s12026-014-8523-2>
34. Bailey M., Kierstein S., Sharma S., Spaitis M., Kinsey S.G., Tliba O., et al. Social stress enhances allergen-induced airway inflammation in mice and inhibits corticosteroid responsiveness of cytokine production. *J. Immunol.* 2009; 182(12): 7888–96. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0990062>
35. Powell N.D., Bailey M.T., Mays J.W., Stiner-Jones L.M., Hanke M.L., Padgett D.A., et al. Repeated social defeat activates dendritic cells and enhances Toll-like receptor dependent cytokine secretion. *Brain Behav. Immun.* 2009; 23(2): 225–31. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.09.010>
36. Bailey M.T., Dowd S.E., Parry N.M., Galley J.D., Schauer D.B., Lyte M. Stressor exposure disrupts commensal microbial populations in the intestines and leads to increased colonization by *Citrobacter rodentium*. *Infect. Immun.* 2010; 78(4): 1509–19. <https://doi.org/10.1128/IAI.00862-09>
37. Bartolomucci A. Social stress, immune functions and disease in rodents. *Front. Neuroendocrinol.* 2007; 28(1): 28–49. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2007.02.001>
38. Whiteley M., Diggle S.P., Greenberg E.P. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature.* 2017; 551(7680): 313–20. <https://doi.org/10.1038/nature24624>
39. Schwab M., Bergonzi C., Sakkos J., Staley C., Zhang Q., Sadowsky M.J., et al. Corrigendum: signal disruption leads to changes in bacterial community population. *Front. Microbiol.* 2021; 12: 691552. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.691552>
40. Sperandio V., Torres A., Jarvis B., Kaper J.B. Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2003; 100(15): 8951–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1537100100>
41. Wahlstrom A., Sayin S.I., Marschall H., Backhed F. Intestinal crosstalk between bile acids and microbiota and its impact on host metabolism. *Cell Metab.* 2016; 24(1): 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.05.005>
42. Gareau M.G., Sherman P.M., Walker W.A. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2010; 7(9): 503–14. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.117>
43. Bosco N., Noti M. The aging gut microbiome and its impact on host immunity. *Genes Immun.* 2021; 22(5-6): 289–303. <https://doi.org/10.1038/s41435-021-00126-8>
44. Francino M.P., Moya A. Effects of antibiotic use on the microbiota of the gut and associated alterations of immunity and metabolism. *EMJ Gastroenterol.* 2013; (1): 74–80. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01543>
45. Robinson C., Young V. Antibiotic administration alters the community structure of the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes.* 2010; (1): 279–84. <https://doi.org/10.4161/gmic.1.4.12614>
46. Willing B., Russell S., Finlay B. Shifting the balance: antibiotic effects on host — microbiota mutualism. *Nat. Rev. Microbiol.* 2011; 9(4): 233–43. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2536>
47. Sandra R.S., González Núñez L., García Del Barco Herrera D., Santos Febles E., Maza Ares D., Millares López R., et al. Role of epidermal growth factor and growth hormone-releasing peptide-6 in acceleration of renal tissue repair after kanamycin overdosing in rats. *Iran J. Kidney. Dis.* 2014; 8(5): 382–8.
48. Tahoun A., Mahajan S., Paxton E., Malterer G., Donaldson D.S., Wang D., et al. Salmonella transforms follicle-associated epithelial cells into M cells to promote intestinal invasion. *Cell Host Microbe.* 2012; 12(5): 645–56. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.10.009>
49. Zelante T., Iannitti R.G., Cunha C., De Luca A., Giovannini G., Pieraccini G., et al. Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity.* 2013; 39(2): 372–85. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.003>
50. Wu W., Sun M., Chen F., Cao A.T., Liu H., Zhao Y., et al. Microbiota metabolite short-chain fatty acid acetate promotes intestinal IgA response to microbiota, which is mediated by GPR43. *Mucosal. Immunol.* 2017; 10(4): 946–56. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.114>
51. Park J., Kim M., Kang S.G., Jannasch A.H., Cooper B., Patterson J., et al. Short chain fatty acids induce both effector and regulatory T cells by suppression of histone deacetylases and regulation of the mTORS6K pathway. *Mucosal. Immunol.* 2015; 8(1): 80–93. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.44>
52. Kazantseva A.V., Davydova Y.D., Enikeeva R.F., Valinurov R.G., Gareeva A.E., Khusnutdinova N.N., et al. The association study of polymorphic variants of hypothalamic-pituitary-adrenal system genes (AVPR1B, OXTR) and aggressive behavior manifestation: a focus on social environment. *Res. Results Biomed.* 2021; 7(3): 232–44. <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2021-7-3-0-3>
53. Shi L.Z., Wang R., Huang G., Vogel P., Neale G., Green D.R., et al. HIF1alpha-dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. *J. Exp. Med.* 2011; 208(7): 1367–76. <https://doi.org/10.1084/jem.20110278>
54. Chang P.V., Hao L., Offermanns S., Medzhitov R. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2014; 111(6): 2247–52. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322269111>
55. Singh N., Gurav A., Sivaprakasam S., Brady E., Padia R., Shi H., et al. Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity.* 2014; 40(1): 128–39. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.12.007>
56. Lee E.Y., Lee Z.H., Song Y.W. CXCL10 and autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* 2009; 8(5): 379–83. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2008.12.002>
57. Avdeeva A.S. IFN- γ -induced protein 10 (IP-10) in rheumatoid arthritis: literature review and the authors own data. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya.* 2017; 55(6): 655–61. <https://doi.org/10.14412/1995-4484-2017-655-661> (in Russian)
58. Round J.L., Mazmanian S.K. Inducible Foxp3+regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *PNAS.* 2010; 107(27): 12204–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909122107>
59. Shida K., Nanno M., Nagata S. Flexible cytokine production by macrophages and T cells in response to probiotic bacteria: a possible mechanism by which probiotics exert multifunctional immune regulatory activities. *Gut Microbes.* 2011; 2(2): 109–14. <https://doi.org/10.4161/gmic.2.2.15661>
60. Verma R., Lee C., Jeun E., Yi J., Kim K.S., Ghosh A., et al. Cell surface polysaccharides of Bifidobacterium bifidum induce the generation of Foxp3(+) regulatory T cells. *Sci. Immunol.* 2018; 3(28): eaat6975. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aat6975>
61. Ghadimi D., Helwig U., Schrezenmeir J., Heller K.J., de Vrese M. Epigenetic imprinting by commensal probiotics inhibits the IL-23/IL-17 axis in an in vitro model of the intestinal mucosal immune system. *J. Leukocyte Biol.* 2012; 92(4): 895–911. <https://doi.org/10.1189/jlb.0611286>
62. Chen L., Zou Y., Peng J., Lu F., Yin Y., Li F., et al. Lactobacillus acidophilus suppresses colitis-associated activation of the IL-23/Th17 axis. *J. Immunol. Res.* 2015; 2015: 909514. <https://doi.org/10.1155/2015/909514>
63. Trabelsi I., Ktari N., Ben Slima S., Hamden K., Ben Salah R. Effect of the probiotic strain Lactobacillus plantarum TN8 on trinitrobenzenesulfonic acid induced colitis in rats. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 2017; 101(2): 311–19. <https://doi.org/10.1111/jpn.12536>
64. Azad A.K., Sarker M., Li T., Yin J. Probiotic species in the modulation of gut microbiota: an overview. *Biomed. Res. Int.*

ОБЗОРЫ

- 2018; 2018: 9478630.
<https://doi.org/10.1155/2018/9478630>
65. Abdollahi-Roodsaz S., Joosten L.A., Koenders M.I., Devesa I., Roelofs M.F., Radstake T.R., et al. Stimulation of TLR2 and TLR4 differentially skews the balance of T cells in a mouse model of arthritis. *J. Clin. Invest.* 2008; 118(1): 205–16.
<https://doi.org/10.1172/JCI32639>
66. Chiba Y., Shida K., Nagata S. Well-controlled pro-inflammatory cytokine responses of Peyer's patch cells to probiotic *Lactobacillus casei*. *Immunol.* 2010; 130(3): 352–62.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03204.x>
67. Liu Y., Fatheree N., Mangalat N. *Lactobacillus reuteri* strains reduce incidence and severity of experimental necrotizing enterocolitis via modulation of TLR4 and NF- κ B signaling in the intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2012; 15: 608–17. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00266.2011>
68. Zarrati M., Shidfar F., Nourijelyani K. *Lactobacillus acidophilus* La5, *Bifidobacterium* BB12, and *Lactobacillus casei* DN001 modulate gene expression of subset specific transcription factors and cytokines in peripheral blood mononuclear cells of obese and overweight people. *Biofactors.* 2013; 39(6): 633–43.
<https://doi.org/10.1002/biof.1128>
69. Shimazu T., Villena J., Tohno M., Fujie H., Hosoya S., Shimosato T., et al. Immunobiotic *Lactobacillus jensenii* elicits anti-inflammatory activity in porcine intestinal epithelial cells by modulating negative regulators of the Toll-like receptor signaling pathway. *Infect. Immun.* 2012; 80(1): 276–88.
<https://doi.org/10.1128/IAI.05729-11>

Информация об авторах

Топол Инна Александровна[✉] — к.б.н., доцент каф. медико-биологических дисциплин Белгородского государственного национального исследовательского университета, Белгород, Россия, innatopol08@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7729-1465>

Полякова Ирина Сергеевна — к.б.н., доцент кафедры медико-биологических дисциплин Белгородского государственного национального исследовательского университета, Белгород, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0228-3513>

Елыкова Анна Владимировна — к.б.н., доцент кафедры медико-биологических дисциплин Белгородского государственного национального исследовательского университета, Белгород, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9511-6895>

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 30.08.2022;
принята к публикации 10.10.2022;
опубликована 30.12.2022

Information about the authors

Inna A. Topol[✉] — Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Department of biomedical disciplines, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, innatopol08@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7729-1465>

Polyakova Irina Sergeevna — Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Department of biomedical disciplines, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0228-3513>

Elykova Anna Vladimirovna — Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Department of biomedical disciplines, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9511-6895>

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 30.08.2022;
accepted for publication 10.10.2022;
published 30.12.2022

ХРОНИКА



РЕЗОЛЮЦИЯ

XII Съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (Москва, 26–28 октября 2022 г.)

В работе Съезда приняли очное участие 2124 делегата и участника из 87 регионов Российской Федерации и 11 стран ближнего и дальнего зарубежья, в том числе специалисты Роспотребнадзора, Минздрава России, Минобороны России, Федерального медико-биологического агентства и других ведомств, медицинских организаций (эпидемиологи, биологи, иммунологи, инфекционисты, педиатры, терапевты, онкологи, микробиологи, вирусологи, паразитологи, биоинформатики и другие специалисты), сотрудники научно-исследовательских институтов различных ведомств, студенты и преподаватели высших учебных заведений, члены профессиональных научных сообществ — Национальной ассоциации специалистов по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского, Федерации лабораторной медицины, а также представители отечественных и зарубежных компаний (производители иммунобиологических и других лекарственных препаратов, медицинских изделий и оборудования).

В обширную научную программу Съезда, девиз которого — «От традиций — к инновациям», вошли пленарное заседание и 24 тематические секции, на которых были доложены 14 пленарных и 229 секционных докладов на самые актуальные темы современной эпидемиологии, микробиологии, паразитологии, вирусологии и вакцинологии. Были рассмотрены и обсуждены проблемы эпидемиологической безопасности, в том числе на международном уровне, вопросы профилактики особо опасных и природно-очаговых инфекций, совершенствования Национального календаря профилактических прививок и организационных основ вакцинопрофилактики, а также глобальные угрозы распространения устойчивости возбудителей инфекционных болезней к противомикробным препаратам. Особое внимание форума было уделено результатам научных исследований в области COVID-19, вопросам дальнейшего совершенствования методов молекулярной диагностики и геномных технологий, внедрения цифровизации в систему эпидемиологического надзора и прогнозирования развития эпидемического процесса новой коронавирусной инфекции. Активно обсуждались вопросы молеку-

лярно-биологических исследований в эпидемиологическом надзоре и диагностике особо опасных инфекций, ВИЧ-инфекции, гепатитов, инфекций с фекально-оральным механизмом передачи, острых респираторных вирусных и микобактериальных инфекций. Важным разделом для обсуждения были вопросы профессиональной подготовки специалистов медико-профилактического профиля.

Съезд отметил, что благодаря активной политике органов, осуществляющих государственный санитарно-эпидемиологический надзор, и органов исполнительной власти в сфере охраны здоровья граждан, научным исследованиям, ориентированным на разработку инновационных технологий борьбы с инфекциями, определены основы урегулирования биологической биобезопасности страны, внедрены новые инструменты эпидемиологического надзора: молекулярно-генетический мониторинг возбудителей, инновационные платформенные решения, моделирование эпидемического процесса.

По поручению Президента Российской Федерации В.В. Путина разработана и внедрена программа «Санитарный щит» страны, целью которой является развитие проактивной и устойчивой системы предупреждения, выявления и реагирования на угрозы биологической безопасности и санитарно-эпидемиологическому благополучию населения.

2022 год — это юбилейный год открытия в 1892 году великим русским учёным Д.И. Ивановским царства вирусов. Отечественная вирусология по прошествии 130 лет со времени описания Д.И. Ивановским первого возбудителя вирусной инфекции продолжает занимать ведущие позиции по ряду приоритетных направлений. В частности, по разработке новых вакцин и изучению формирования и эволюции популяционного генофонда возбудителей новых и возвращающихся инфекций, представляющих национальную и глобальную угрозу биобезопасности населения и среды обитания. Осмысленное сочетание теоретических подходов изучения эволюции вирусов с инновационными методами исследования молекулярно-генетических свойств вирусов и создание на этой основе новых поколений вакцин и противовирусных препаратов

ХРОНИКА

обеспечат существенную минимизацию последствий грядущих пандемий.

На государственном уровне утверждена Стратегия развития вакцинопрофилактики в РФ на период до 2035 г., определившая современные национальные стратегии иммунизации; разработаны новые отечественные вакцины: сезонные гриппозные, включая квадριвалентные; для профилактики COVID-19, позволившие переломить тенденции развития пандемии, первые пентавакцины — АКДС-Геп В+Ніb, содержащие цельноклеточную коклюшную вакцину и бесклеточную коклюшную вакцину, включая вакцину для иммунизации взрослых; вакцина нового поколения против клещевого энцефалита с репродукцией вируса на линии перевиваемых клеток; комбинированная вакцина корь-паротит-краснуха; инактивированная вакцина против полиомиелита и др. Внесены изменения в Национальный календарь профилактических прививок (расширены контингенты для иммунизации против Ніb-инфекции и полиомиелита). Создан Независимый экспертный совет Союза экспертов в области иммунопрофилактики. Внедрены риск-ориентированные технологии иммунизации, разработаны и внедрены риск-коммуникации по обеспечению приверженности населения к вакцинопрофилактике, осуществлён переход от управления вакцинопрофилактикой на основе оценки заболеваемости к управлению рисками недостаточной эффективности вакцинопрофилактики.

На государственном уровне утверждена Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 г., которая определяет государственную политику по предупреждению и ограничению распространения устойчивости микроорганизмов к противомикробным препаратам, химическим и биологическим средствам в Российской Федерации. Особое внимание было посвящено антибиотикорезистентным бактериальным патогенам клинического и пищевого происхождения. Анализ структуры геномов изученных патогенов клинического и пищевого происхождения выявил их гетерогенность и различные изменения в пределах конкретных линий, дал представление о дальнейшей динамике их эволюции. Полученные данные показали, что даже в пределах одной линии патогенные изоляты могут иметь отличительные особенности, сформировавшиеся в процессе динамических эволюционных изменений в течение определённого времени.

Эффективность борьбы с опасными и актуальными инфекциями в современном глобальном мире во многом базируется на принципах построения единого эпидемиологического пространства, что предусматривает тесное сотрудничество как на двусторонней основе, так и на площадках меж-

дународных формирований, таких как СНГ, ЕАЭС, ШОС, БРИКС, Всемирная организация здравоохранения.

С целью профилактики вирусных инфекций изучено большое количество вирулицидов различного назначения. Дана оценка бактерицидных и фунгицидных свойств указанных средств. Отмечено, что поиск новых средств необходимо проводить с учётом импортозамещения. Большое значение в профилактике инфекционных болезней имеют разработка и изучение технических средств дезинфекции. Изучены и предложены технологии, основанные на применении фотокатализа, ионизации, озона, светодиодов и др. Предложены принципы их выбора в зависимости от эффективности и условий применения.

В рамках Съезда были рассмотрены вопросы, связанные с системой подготовки специалистов медико-профилактического профиля, в частности: применение информационных технологий в практической подготовке обучающихся по специальностям медико-профилактического профиля, подготовка специалистов в области биологической безопасности, совершенствование преподавания эпидемиологии и паразитологии, преподавание эпидемиологии, микробиологии, вирусологии, иммунологии в рамках как додипломного, так и постдипломного образования.

Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека при поддержке Правительства РФ осуществляется реализация ряда программ, ориентированных на укрепление национальных систем здравоохранения и направленных на борьбу с распространением инфекционных болезней. Основные направления взаимодействия: укрепление материально-технической базы профильных учреждений страны, подготовка кадров, выполнение совместных научных работ и экспедиций по мониторингу природных очагов инфекционных болезней. Значительный объём экспедиционной работы проведён в странах СНГ, Социалистической Республике Вьетнам, Гвинейской Республике. В рамках научного сотрудничества выполняются совместные проекты по молекулярно-генетическому мониторингу возбудителя новой коронавирусной инфекции, по оценке популяционного иммунитета к SARS-CoV-2.

Съезд постановил:

1. Принять отчет Президиума и признать работу Общероссийской общественной организации «Всероссийское научно-практическое общество эпидемиологов, микробиологов и паразитологов» в 2017-2022 гг. удовлетворительной.
2. Утвердить отчет ревизионной комиссии.
3. Избрать Председателем Президиума Общества академика РАН, д.м.н., профессора В.Г. Акимкина.

4. Определить приоритетные направления деятельности Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов в области эпидемиологического надзора и профилактики инфекционных болезней на 2022–2027 гг:

Научно-практическая деятельность:

- актуализировать научные инновационные исследования в области эпидемиологии, микробиологии, паразитологии, вирусологии и диагностики инфекционных болезней; инициировать научные исследования в области совершенствования методов обеспечения биологической безопасности населения, методологии оценки риска инфицирования при различных медицинских технологиях и условиях оказания медицинской помощи;
- признать необходимым проведение исследований по разработке стратегий и методов использования цифровой эпидемиологии с последующей интеграцией в существующую практику для обеспечения мониторинга и эпидемиологического надзора за инфекционными болезнями; развивать научные исследования, направленные на разработку платформ для последующего конструирования отечественных вакцин и сокращения сроков их внедрения в практику до 4 месяцев; совершенствование Национального календаря профилактических прививок, приведение в соответствие с эпидемической ситуацией стратегий и тактик иммунизации населения, внедрение технологий цифровой трансформации с обеспечением непрерывности процесса иммунизации детей и взрослых;
- совершенствовать технологии обеспечения безопасности иммунопрофилактики и системного мониторинга за инфекциями, передаваемыми половым путём, механизмы обеспечения граждан иммунобиологическими лекарственными препаратами, сохранения доверия и обеспечения приверженности к вакцинопрофилактике медицинских работников, органов исполнительной и законодательной власти, средств массовой информации и населения в целом;
- активизировать исследования по совершенствованию мер предупреждения и ограничения распространения возбудителей с антимикробной резистентностью, изучению механизмов возникновения антимикробной резистентности, разработке противомикробных препаратов и альтернативных методов, технологий и средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных заболеваний человека, животных и растений; развивать межведомственное взаимодействие и международное сотрудничество по данному направлению;
- активизировать исследования по изучению вирусов гриппа и SARS-CoV-2 с идентификацией видов, субтипов, линий и их генетических вариантов, а также изучение популяционного иммунитета; определить приоритетные текущие потребности и критические точки, нуждающиеся в оптимизации существующих систем эпидемиологического надзора за острыми инфекциями, передающимися воздушно-капельным путем; сформировать интегрированную систему эпидемиологического и вирусологического надзора за гриппом, SARS-CoV-2 и другими респираторными вирусами с использованием интерактивных баз данных;
- продолжить мониторинг за циркуляцией серотипов пневмококков для своевременной коррекции состава вакцин с учётом смены ведущих серотипов возбудителя, а также исследования для определения уровней популяционного иммунитета и выявления наиболее уязвимых групп населения;
- проводить систематический мониторинг эпидемиологических угроз и прогноз эпидемиологической ситуации по особо опасным инфекциям, включая появление новых инфекций и преодоление патогенами межвидовых барьеров;
- активизировать исследования по изучению и оценке современного состояния природных очагов инфекционных болезней с использованием геоинформационных систем и других информационных технологий, систем дистанционного зондирования земли, прогнозное моделирование их активности;
- продолжить исследования по разработке и внедрению качественно новых систем индикации патогенных биологических агентов и лабораторной диагностики инфекционных болезней на основе современных технологий молекулярно-генетического анализа (петлевая изотермическая амплификация, метагеномный анализ и др.);
- активизировать работу по формированию с учётом регионального компонента перспективных программ и комплексных планов профилактических и противопаразитарных мероприятий, базирующихся на межведомственном взаимодействии учреждений и организаций Роспотребнадзора, медицинских организаций, санитарно-ветеринарных и коммунальных служб;
- продолжить работу по углублённому изучению штаммов возбудителей инфекционных болезней для формирования отечественных биоинформационных ресурсов, таких как каталог патогенных микроорганизмов и биотоксинов, используя систему VGARus;
- актуализировать исследования по изучению эпидемиологических особенностей инфекционных, паразитарных и неинфекционных болезней на

ХРОНИКА

- современном этапе и факторов, определяющих тенденции их развития;
- разработать алгоритмы лабораторной диагностики возбудителей инфекционных болезней на основе широкого внедрения молекулярно-биологических методов в формате мультиплексного анализа;
 - совершенствовать научные и методические основы биобезопасности, системы противоэпидемических мероприятий при чрезвычайных ситуациях санитарно-эпидемиологического характера;
 - совершенствовать научные и методические основы применения бактериофагов с целью профилактики инфекционных болезней;
 - обеспечить эффективное противодействие социально значимым инфекциям, таким как ВИЧ/СПИД, туберкулёз и др., активизировать исследования по дальнейшему совершенствованию средств профилактики, диагностики и лечения этих болезней;
 - поддержать инициативу Роспотребнадзора по восстановлению лицензирования дезинфекционной деятельности для обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения;
 - активизировать публикационную активность членов ВНПОЭМП в целях популяризации достижений отечественной науки;
 - содействовать повышению научного потенциала профильных научных журналов, актуализации тематики и повышения качества научных исследований;
 - увековечить память о Д.И. Ивановском в названии улиц, сооружении памятника Д.И. Ивановскому в Санкт-Петербурге, где учился Дмитрий Ивановский, и в Москве – столице России; возродении премии им. Д.И. Ивановского в РАН и в более основательном изложении в школьных учебниках открытия выдающегося российского учёного и его значения для жизни людей, развития науки и для медицины.

Профессиональная подготовка кадров:

- разработать образовательные санитарно-просветительские программы, начиная с детского сада и школы и заканчивая высшими учебными заведениями;
- разработать эффективные механизмы притока лиц молодого возраста на профильные кафедры вузов, в учреждения и органы здравоохранения и Роспотребнадзора;
- совершенствовать систему подготовки кадров в системе додипломного и дополнительного профессионального образования эпидемиологов, микробиологов, паразитологов с включением вопросов молекулярной биологии, биоинформа-

тики, инновационных технологий эпидемиологического надзора;

- актуализировать и усилить вопросы вакцинопрофилактики в федеральных государственных образовательных стандартах, примерных учебных программах на всех уровнях подготовки врачей (специалитет, ординатура, аспирантура, дополнительное профессиональное образование) всех специальностей, ходатайствовать перед Министерством здравоохранения о выделении вакцинопрофилактики как отдельной дисциплины в учебных планах подготовки врачей по всем специальностям;
- рассмотреть целесообразность организации и создания в рамках ВНПОЭМП междисциплинарного подразделения для разработки методик по использованию современных математических методов в практике здравоохранения с привлечением специалистов высокого уровня из смежных с эпидемиологией наук (математика, физика, химия и др.);
- оптимизировать экспертную оценку уровня профессиональной подготовки специалистов медико-профилактического профиля.

Экспертная работа:

- участвовать в экспертной работе по санитарно-эпидемиологическому нормированию, экспертизе научных федеральных, отраслевых и региональных проектов и программ по проблемам эпидемиологии, микробиологии и паразитологии;
- взаимодействовать на уровне различных ведомств и организаций по подготовке экспертных заключений.

Съезд поручил Президиуму и Правлению Общества:

- активизировать связь с региональными отделениями, расширить участие членов Президиума и Правления в работе на местах, привлекать ведущих учёных и организаторов здравоохранения к участию в мероприятиях Общества;
- совместно с региональными отделениями активизировать работу по разъяснению через средства массовой информации важности предупреждения инфекционных и паразитарных болезней и эффективности мер профилактики, популяризации научных исследований;
- активно информировать население через средства массовой информации и научные издания о важности и безопасности иммунопрофилактики инфекционных болезней;
- участвовать в подготовке проектов федеральных, отраслевых и региональных программ по проблемам эпидемиологии, микробиологии и паразитологии;

- расширять взаимодействие, контакты и проведение совместных мероприятий с родственными научными и научно-практическими обществами России, стран СНГ, Европы, Международным союзом микробиологических обществ, Федерацией европейских микробиологов, Всемирной организацией здравоохранения и другими сообществами;
- регулярно оценивать работу профильных научных журналов.