

2

МАРТ – АПРЕЛЬ

Том 100
2023

Ж
М
Э
И

ЖУРНАЛ
МИКРОБИОЛОГИИ
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И
ИММУНОБИОЛОГИИ

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

JOURNAL

OF MICROBIOLOGY
EPIDEMIOLOGY
AND
IMMUNOBIOLOGY

2

MARCH – APRIL

VOLUME 100
2023

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).

В соответствии с рекомендациями ВАК (письмо ВАК от 06.12.2022 № 02-1198), журнал относится к категории K1 как издание, входящее в базы данных SCOPUS и RSCI.

2

МАРТ – АПРЕЛЬ

**ТОМ 100
2023**

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:

ГК «Урал-пресс», индекс: 71436.

Тел.: +7(343) 262-65-43.

E-mail: info@ural-press.ru.

**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
принимают условия договора публичной
оферты (<https://microbiol.elpub.ru/jour>).

Подписано в печать 28.04.2023.

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, 2023

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Зверев В.В., д.б.н., проф., acad. РАН, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии,
иммунологии, Первый Московский государственный медицинский университет
им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Заместитель главного редактора

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

Ответственный секретарь

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Российские члены редакционной коллегии

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

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

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

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

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

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

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

Караулов А.В., д.м.н., проф., acad. РАН, зав. кафедрой
клинической иммунологии и аллергологии Института
клинической медицины, Первый Московский государ-
ственный медицинский университет им. И.М. Сеченова
(Сеченовский Университет), Москва

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

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

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

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

Иностранные члены редакционной коллегии

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

Shubhada Voropamage, 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., acad. РАН, советник
директора, ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора,
Москва

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Мионов К.О., д.м.н., зав. лаб. молекулярных методов
изучения генетических полиморфизмов ФБУН ЦНИИ
Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

Никонова А.А., к.б.н., зав. лаб. молекулярной
биотехнологии 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).

In accordance with the recommendations of the Higher Attestation Commission (letter of the Higher Attestation Commission dated December 06, 2022 No. 02-1198), the Journal belongs to the K1 category, as a publication included in the SCOPUS and RSCI databases.

2

MARCH-APRIL

VOLUME 100

2023

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:

Ural Press: 71436.
Tel.: +7(343) 262-65-43.
E-mail: info@ural-press.ru.

Full texts of issues of the journal are available:

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

FOUNDERS:

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

PUBLISHER:

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

EDITORIAL OFFICE:

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

Head of the Editorial and publishing department:

Olga V. Osokina

Head of Editorial Office:

Olga V. Ustinkova

The Editorial Board is not responsible for the advertising content.

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

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

Signed to the press on April 28, 2023. 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, 2023

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. Zhironov, 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, Turcklab, 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

Georgiy 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

Alexander N. Lukashev, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director, Martinsonsky 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

Georgiy 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

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

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

Свитич О.А., Нагиева Ф.Г., Курбатова Е.А., Баркова Е.П., Харченко О.С., Строева А.Д., Пашков Е.А., Лисаков А.Н., Грачева А.В., Потапова М.Б., Файзуллоев Е.Б., Зверев В.В. Вирусингибирующая активность комплекса антигенов условно-патогенных бактерий в отношении коронавируса SARS-CoV-2*	143
Куликова Н.Г., Чернышков А.В., Михайлова Ю.В., Зенькович А.Л., Довнар Д.А., Марейко А.М., Битюмина Л.А., Шеленков А.А., Егорова А.Е., Саенко С.С., Манзенюк И.Н. Устойчивость к противомикробным препаратам пищевых изолятов <i>Salmonella enterica</i> на территории Республики Беларусь*	153
Степанова Т.Ф., Катаева Л.В., Посоюзных О.В., Богун А.Г., Кисличкина А.А., Tran Thi Nhai Структура ESKAPE-патогенов, изолированных от пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии новорождённых Национального госпиталя педиатрии г. Ханой, Социалистическая Республика Вьетнам*	168
Печковский Г.А., Еременко Е.И., Рязанова А.Г., Писаренко С.В., Шапаков Н.А., Аксенова Л.Ю., Семенова О.В., Тимченко Л.Д., Куличенко А.Н. Разработка метода молекулярного субтипирования <i>Bacillus anthracis</i> с использованием HRM ПЦР	178
Селянская Н.А., Титова С.В., Меньшикова Е.А. Антибиотикочувствительность холерных вибрионов в сложных биоплёнках, сформированных на различных субстратах	188
Самодова О.В., Кригер Е.А., Рогушина Н.Л., Звездина Ю.М., Шагров Л.Л. Гуморальный иммунитет к коклюшу у медицинских работников	196
Ижбердеева М.П., Сауткина А.А., Баркова И.А., Викторов Д.В. Антигенная идентичность иммунодоминантных белков геновариантов <i>Bacillus anthracis</i>	203
Циркунова Ж.Ф., Емельянова А.А., Гудкова Е.И., Скороход Г.А. Влияние повидон-йода на чувствительность клинических изолятов <i>Klebsiella pneumoniae</i> к антибиотикам	209
ОБЗОРЫ	
Киреев Д.Е., Кириченко А.А., Лопатухин А.Э., Шлыкова А.В., Галкин Н.Ю., Савельев Е.В., Глазов М.Б., Покровский В.В., Акимкин В.Г. Российская база данных устойчивости ВИЧ к антиретровирусным препаратам*	219
Маркин В.А. Иммуногенез при лихорадке Ласса и перспективы разработки вакцины	228
Базанова Л.П., Никитин А.Я., Токмакова Е.Г. Агрегированность <i>Yersinia pestis</i> как функциональная адаптация к организму блохи (обзор)	240
НЕКРОЛОГИ	
Памяти Николая Николаевича Носика (7 апреля 1932 года – 19 марта 2023 года)	251

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

CONTENTS

ORIGINAL RESEARCHES

Svitich O.A., Nagieva F.G., Kurbatova E.A., Barkova E.P., Kharchenko O.S., Stroeveva A.D., Pashkov E.A., Lisakov A.N., Gracheva A.V., Potapova M.B., Faizuloev E.B., Zverev V.V. Virus-inhibitory activity of the antigen complex of opportunistic pathogenic bacteria against SARS-CoV-2*	143
Kulikova N.G., Chernyshkov A.V., Mikhaylova Yu.V., Zenkovich A.L., Dovnar D.A., Mareyko A.M., Bityumina L.A., Shelenkov A.A., Egorova A.E., Saenko S.S., Manzenyuk I.N. Antimicrobial resistance in foodborne <i>Salmonella enterica</i> isolates in the Republic of Belarus*	153
Stepanova T.F., Kataeva L.V., Posoyuznykh O.V., Bogun A.G., Kislichkina A.A., Tran Thi Nhai The structure of ESKAPE pathogens isolated from patients of the neonatal intensive care unit at the National Hospital of Pediatrics in Hanoi, the Socialist Republic of Vietnam*	168
Pechkovskii G.A., Eremenko E.I., Ryazanova A.G., Pisarenko S.V., Shapakov N.A., Aksenova L.Y., Semenova O.V., Timchenko L.D., Kulichenko A.N. Development of a method for molecular subtyping <i>Bacillus anthracis</i> using HRM PCR	178
Selyanskaya N.A., Titova S.V., Menshikova E.A. Antibiotic sensitivity of cholera vibrios in biofilms formed on various substrates	188
Samodova O.V., Krieger E.A., Rogushina N.L., Zvezdina U.M., Shagrov L.L. Humoral immunity against pertussis among healthcare workers	196
Izhberdeeva M.P., Sautkina A.A., Barkova I.A., Victorov D.V. Antigenic identity of immunodominant proteins of <i>Bacillus anthracis</i> genovariants	203
Tsirkunova Zh.F., Emelyanova A.A., Gudkova E.I., Skorokhod G.A. Influence of povidone-iodine on the sensitivity of clinical isolates of <i>Klebsiella pneumoniae</i> to antibiotics	209
REVIEWS	
Kireev D.E., Kirichenko A.A., Lopatukhin A.E., Shlykova A.V., Galkin N.Yu., Saveler E.V., Glazov M.B., Pokrovsky V.V., Akimkin V.G. The Russian database of HIV antiretroviral drug resistance*	219
Markin V.A. Immunogenesis in Lassa fever and prospects for vaccine development	228
Bazanova L.P., Nikitin A.Ya., Tokmakova E.G. The <i>Yersinia pestis</i> aggregation as a functional adaptation to the flea organism (review)	240
OBITUARIES	
In memory of Nikolay Nikolaevich Nosik (April 7, 1932 – March 19, 2023)	251

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



Virus-inhibitory activity of the antigen complex of opportunistic pathogenic bacteria against SARS-CoV-2

Oksana A. Svitich¹, Firaya G. Nagieva^{1✉}, Ekaterina A. Kurbatova¹, Elena P. Barkova¹, Olga S. Kharchenko¹, Alexandra D. Stroeva¹, Evgeny A. Pashkov¹, Aleksey N. Lisakov¹, Anastasiya V. Gracheva¹, Mariia B. Potapova², Evgeny B. Faizuloev¹, Vitaly V. Zverev¹

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

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

Abstract

Introduction. The antigen complex of opportunistic pathogenic bacteria (ACOPB) has a protective effect against avian influenza viruses, herpes virus type 2, and other viruses that cause acute respiratory viral infections. In the context of the COVID-19 pandemic, an important task is to find out whether ACOPB has a protective effect against SARS-CoV-2.

The **purpose** of the study was to evaluate *in vitro* the ACOPB virus-inhibitory activity against the Dubrovka laboratory strain of SARS-CoV-2.

Materials and methods. The study was performed using Vero cell line CCL-81, human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), mouse monoclonal anti-idiotypic antibodies structurally mimicking biological effects of human interferons (IFNs), the Dubrovka laboratory strain of SARS-CoV-2. The infectivity of the virus was assessed by two methods: by virus titration using cell cultures and the limiting dilution method when the results are assessed by a cytopathic effect; the second method was a plaque assay. The *in vitro* virus inhibition test was performed using the cell culture susceptible to SARS-CoV-2; the mixture containing a specific dose of the virus and a two-fold dilution of ACOPB was transferred to the cell culture after the ACOPB medication had interacted with the virus at 4°C for 2 hours. The ACOPB virus-inhibitory activity against SARS-CoV-2 was assessed by the functional activity of α/β and γ IFN receptors (R_{IFN}) in human PBMCs induced *in vitro* by ACOPB and the ACOPB mixture with the specific dose of SARS-CoV-2. The R_{IFN} expression level was measured by the indirect membrane immunofluorescence test.

Results. Hemagglutination assay using chicken, mouse, guinea pig, and human red blood cells was performed for detection of the SARS-CoV-2 inhibitory protein. The lysate of Vero CCL-81 cells infected with SARS-CoV-2 Dubrovka demonstrated the highest hemagglutination activity with guinea pig red blood cells and low titers of hemagglutination in the virus-containing fluid. The virus inhibition test in the Vero CCL-81 cell culture demonstrated that ACOPB inhibited 10 doses of SARS-CoV-2 Dubrovka with the titer 1 : 32, providing 100% protection of the cell culture for 8 days (the monitoring period). ACOPB induced α/β and γ R_{IFN} expression on membranes of human PBMCs in *in vitro* cultures and decreased R_{IFN} α/β and γ expression after its interaction with SARS-CoV-2 Dubrovka.

Conclusion. The experimental studies including the virus inhibition test in the cell culture susceptible to SARS-CoV-2 Dubrovka and the indirect membrane immunofluorescence assay using monoclonal anti-idiotypic antibodies mimicking IFN-like properties demonstrated that ACOPB had both an immunomodulatory and a virus-inhibitory effect.

Keywords: *antigen complex of opportunistic pathogenic bacteria, human peripheral blood mononuclear cells, in vitro culture, SARS-CoV-2 coronavirus, interferon receptors, receptor expression, virus inhibition test, immunomodulatory effect*

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera (protocol No. 1, January 24, 2023).

Funding. The study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement No. 075-15-2021-676 of 28/7/2021).

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

For citation: Svitich O.A., Nagieva F.G., Kurbatova E.A., Barkova E.P., Kharchenko O.S., Stroeva A.D., Pashkov E.A., Lisakov A.N., Gracheva A.V., Potapova M.B., Faizuloev E.B., Zverev V.V. Virus-inhibitory activity of the antigen complex of opportunistic pathogenic bacteria against SARS-CoV-2. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2023;100(2):143–152.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-309> EDN: <https://www.elibrary.ru/malutz>

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-309>

Вирусингибирующая активность комплекса антигенов условно-патогенных бактерий в отношении коронавируса SARS-CoV-2

Свитич О.А.¹, Нагиева Ф.Г.¹, Курбатова Е.А.¹, Баркова Е.П.¹, Харченко О.С.¹, Строева А.Д.¹, Пашков Е.А.¹, Лисаков А.Н.¹, Грачева А.В.¹, Потапова М.Б.², Файзулоев Е.Б.¹, Зверев В.В.¹

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

²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Аннотация

Введение. Комплекс антигенов условно-патогенных бактерий (КАУПБ) обладает протективным эффектом в отношении вируса гриппа птиц, вируса герпеса 2-го типа и других вирусов, вызывающих острые респираторные вирусные заболевания. В связи с пандемией COVID-19 актуально выяснить, обладает ли КАУПБ протективным эффектом в отношении коронавируса SARS-CoV-2.

Цель работы — изучить *in vitro* вирусингибирующую активность КАУПБ в отношении лабораторного штамма коронавируса SARS-CoV-2 Dubrovka.

Материалы и методы. В работе использовали клеточную линию Vero CCL-81, моноуклеарные клетки периферической крови человека (МКПК), мышинные моноклональные антиидиотипические антитела, структурно имитирующие биологические эффекты интерферонов (ИФН) человека, лабораторный штамм вируса SARS-CoV-2 Dubrovka. Инфекционную активность вируса определяли двумя методами: титрованием вируса методом предельных разведений на клеточных культурах с оценкой результатов по цитопатическому действию и методом бляшкообразования. Реакция ингибирования вируса поставлена *in vitro* на клеточной культуре, чувствительной к вирусу SARS-CoV-2, с внесением в клеточную культуру смеси определённой дозы вируса к двукратным разведениям КАУПБ после предварительного 2-часового взаимодействия препарата с вирусом при 4°C. Вирусингибирующую активность КАУПБ в отношении SARS-CoV-2 определяли по показателям функциональной активности α/β - и γ -рецепторов ИФН ($P_{\text{ИФН}}$) на МКПК человека, индуцированных *in vitro* КАУПБ и смесью КАУПБ с определённой дозой вируса SARS-CoV-2. Уровень экспрессии $P_{\text{ИФН}}$ оценивали в реакции непрямой мембранной иммунофлуоресценции.

Результаты. Для выявления ингибирующего белка SARS-CoV-2 поставлена реакция гемагглютинации с эритроцитами кур, мышей, морских свинок и человека. В лизате клеток Vero CCL-81, инфицированных SARS-CoV-2 Dubrovka, обнаружены максимальная гемагглютинирующая активность с эритроцитами морской свинки и низкие титры гемагглютинации в вирусосодержащей жидкости. В реакции ингибирования вируса на культуре клеток Vero CCL-81 КАУПБ ингибировал 10 доз SARS-CoV-2 Dubrovka с титром 1 : 32 со 100% защитой клеточной культуры в течение 8 сут (период наблюдения). КАУПБ индуцировал экспрессию $P_{\text{ИФН}}-\alpha/\beta$ и $-\gamma$ на мембранах МКПК человека при культивировании *in vitro* и снижал экспрессию $P_{\text{ИФН}}-\alpha/\beta$ и $-\gamma$ при предварительном взаимодействии с SARS-CoV-2 Dubrovka.

Заключение. На основе экспериментальных исследований, включающих реакцию ингибирования вируса на культуре клеток, чувствительных к SARS-CoV-2 Dubrovka, и в реакции непрямой мембранной иммунофлуоресценции с использованием для детекции моноклональных антиидиотипических антител, имитирующих ИФН-подобные свойства, продемонстрировано, что КАУПБ обладает иммуномодулирующей и вирусингибирующей активностью.

Ключевые слова: комплекс антигенов условно-патогенных бактерий, моноуклеарные клетки периферической крови человека, культивирование *in vitro*, коронавирус SARS-CoV-2, интерфероновые рецепторы, экспрессия рецепторов, реакция ингибции вируса, иммуномодулирующий эффект

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (протокол № 1 от 24.01.2023).

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-676 от 28.07.2021).

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

Для цитирования: Свитич О.А., Нагиева Ф.Г., Курбатова Е.А., Баркова Е.П., Харченко О.С., Строева А.Д., Пашков Е.А., Лисаков А.Н., Грачева А.В., Потапова М.Б., Файзулоев Е.Б., Зверев В.В. Вирусингибирующая активность комплекса антигенов условно-патогенных бактерий в отношении коронавируса SARS-CoV-2. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(2):143–152.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-309> EDN: <https://www.elibrary.ru/malutz>

Introduction

In the past few decades, a significant breakthrough has been made in the studies of cellular and molecular mechanisms of immunity. The previously established views of the role played by innate immunity in resistance to a wide range of pathogens and in activation of the adaptive immunity have been revised. It has been found that some bacterial antigens (lipopolysaccharides, peptidoglycans, protein antigens on the cell wall, etc.) are involved in controlling the innate immunity system [1, 2].

Activation of TLR-mediated mechanisms of innate immunity through ligands of Toll-like receptors triggers protection against different pathogens. The antigen complex of opportunistic pathogenic bacteria (ACOPB) is used for activation of innate immunity and protection against viral infections. Previous studies assessed the ACOPB protective effect against avian influenza virus serotype H5N2 and herpes virus type 2 [3–5]. ACOPB is used for prevention and treatment of acute respiratory infections, chronic inflammatory diseases of upper and lower respiratory tract, bronchial asthma, atopic dermatitis, pollinosis, latex allergy, etc. Clinical trials showed that immunotherapy including ACOPB, together with the background therapy, resulted in improvement of the phagocytic activity of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), and increased the synthesis of interferons (IFN)- α and - γ , etc. [6–9].

SARS-CoV-2 is responsible for the coronavirus infection that caused the pandemic in 2019. Severe disease and fatal outcomes resulting from this infection are associated with damage to the lungs, cardiovascular system, kidneys, and central nervous system. Significant efforts are being made to create antiviral therapeutic and preventive medications [10–12].

The **purpose** of the study was to evaluate *in vitro* the ACOPB virus-inhibitory effect against SARS-CoV-2 Dubrovka.

Materials and methods

The study was performed using strains from the collection of the common use center of the Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, with funding from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement No. 075-15-2021-676 of 28/7/2021).

ACOPB is a next-generation medication representing a complex of antigens activating expression of receptors in cells of the innate immunity system (Toll-like receptors 1/2, 4, 5, 2/6, 9), thus providing its effectiveness against a wide range of pathogens and allergy. The medication was created using antigenic components extracted from *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*.

Cell cultures

The study was performed using the continuous green monkey kidney-derived Vero CCL-81 cell line

from the American Type Culture Collection. Cells were grown in the DMEM/F12 basal medium (PanEco) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS; HyClone) and 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of gentamicin.

PBMCs were collected from O-positive donors. The study was performed with voluntary informed consent of the participants.

Monoclonal anti-idiotypic antibodies to IFN- α and - γ receptors (R_{IFN}) were obtained by injecting mouse lymphatic hybridomas producing antibodies with an internal image of human IFN- α/β and - γ to syngeneic BALB/c mice, which was followed by collection and purification of ascitic fluid containing the above antibodies [14, 15].

SARS-CoV-2 coronavirus

The SARS-CoV-2 Dubrovka virus was obtained by isolating the virus in the Vero cell culture from the clinical specimen. For this purpose, we used an oropharyngeal swab collected from a 61-year-old female patient, in which the real-time RT-PCR detected a high level of SARS-CoV-2 RNA (8.82 lg TCD₅₀/ml). Later, the patient developed clinical symptoms of COVID-19: cough, shortness of breath, fever, loss of taste and smell. The thoracic CT showed typical lung tissue consolidation with the total affected area from both sides reaching 50%, and the patient was diagnosed with COVID-19, virus identified (U07.1, ICD-10); community-acquired bilateral polysegmental viral pneumonia. The test was performed with the patient's voluntary informed consent.

The Vero cell culture was infected with clinical material and incubated in the CO₂ incubator for 5 days until reaching the cytopathic effect (CPE) manifested by cell rounding; then, the next passaging was performed. To identify the virus, the material obtained at different passaging levels was tested for the presence of SARS-CoV-2 RNA using the real-time reverse transcription polymerase chain reaction and primers for the *N* gene. At the 2nd, 7th, 14th, and 21st passages, high levels of SARS-CoV-2 RNA (9.0, 9.7, 9.2, and 9.9 lg RNA copies/mL, respectively) were detected in the culture liquid. The isolate was assigned to species SARS-CoV-2 (clade GH) by sequencing the *S* gene (GenBank accession number MW514307) [13].

The virus infectivity was measured by two methods: the limiting dilution in cell cultures grown in 48-well plates (Thermo Scientific/Nunc) based on CPE and the plaque assay (PFU₅₀) [18] in our modification. Both methods used for measuring the infectivity of viruses causing CPE in the cell culture, which is manifested by cell rounding, should be confirmed by another method of virus infectivity assessment to differentiate CPE from apoptosis.

Tenfold dilutions of the virus-containing fluid (VCF) were prepared starting from dilution 10⁻¹ to 10⁻⁸ using the DMEM basal medium with 2% FBS. The growth medium was removed from 48-well plates

with the Vero CCL-81 cell monolayer; the cell monolayer was washed one time with Hanks' solution. Then, 0.2 ml of each VCF dilution was dispensed into 6 wells of the plate; 0.2 ml of basal medium was dispensed into the control wells. The interaction between VCF and the cells continued in an incubator for 1 hour at 36.5°C and 5% CO₂. After the interaction was over, 0.8 or 0.9 ml of basal medium (the serum-free DMEM medium) was added to each well, including wells with control cells.

The titration results were assessed on the 4th–5th day from the infection of the cell culture. The virus titer was expressed as the highest virus dilution causing CPE in 50% of infected cell cultures in the absence of cell destruction in the uninfected cell cultures.

Prior to the plaque assay, the Vero CCL-81 cell culture was grown in the growth medium in 12-well plates. 24–48 hours after a confluent cell monolayer had been formed, the medium was removed; the cell monolayer was washed with Hanks' solution. 0.1 ml or 0.2 ml of tenfold VCF dilutions were dispensed into 3 wells, into the central area. One well was left uninfected for cell culture control. The contact between the virus and the cells continued in an incubator for 1.5 hours at 36.5°C and 5% CO₂. The remaining liquid was removed from all the wells, including the control well, and 2 ml of agar overlay consisting of 0.5% Noble agar and DMEM medium with 4% FBS was added to each of them. After the agar overlay had solidified at room temperature, the plates were incubated in the incubator at 36.5°C and 5% CO₂. On the 5th day, 1 ml of 10% trichloroacetic acid solution or 3% paraformaldehyde solution was dispensed onto the agar overlay and the plates were incubated in the incubator for 1 hour. After the cells had been fixed, the agar overlay was removed by shaking; the cell monolayer was washed with water; the tray was dried, and 1 ml of 0.1% gentian violet solution was dispensed into wells and remained there for 2–3 min. Then, the tray was washed with running water and dried. The number of plaques was counted for each well. The average number of plaques from 3 wells for each virus dilution was calculated. The virus titer was expressed as logarithms PFU₅₀/0.1 ml, using the formula:

$$X = A \times B/0.2,$$

where X is a titer in PFU per 1 ml; A is the average number of plaques; B is the virus dilution; 0.2 — the amount of inoculum (ml) dispensed into one well.

Hemagglutination assay

Hemagglutination is defined as the ability of some viruses to agglutinate red blood cells in certain mammalian and avian species. Viruses exhibit their hemagglutination properties selectively toward red blood cells of certain animal species. Some viruses can affect a wide range of animal species, while other viruses can affect only a limited range of species. There is a relationship

between infectivity and hemagglutination properties of the virus. The source of the virus is important for the results of the hemagglutination assay (HA). The hemagglutination properties of the virus are not displayed in any virus-containing material. For example, using HA, the influenza virus can be detected in nasopharyngeal washes from a sick person (occasionally), in embryonic tissue cultures, and in suspensions of infected mouse lungs [16].

HA was used for detection of the presence or absence of viral hemagglutinin in cells infected with SARS-CoV-2 and in VCF. For this purpose, we used for types of red blood cells: chicken, mouse, guinea pig, and human. The test involved agglutination of red blood cells by the viral hemagglutination antigen. HA was performed in round-bottom 96-well plates (SPL Life Sciences, Ltd.) and included twofold dilution of antigens in 100 µl of saline solution and adding of the equal amount of 0.25% red cell suspension to each dilution. The specimens remained exposed to red blood cells at 4°C for 1.0–1.5 hours until red blood cells settled down in the control wells; then, the HA results were assessed. The hemagglutination titer of the virus was expressed as the highest dilution of the antigen, at which agglutination was observed.

Virus replication inhibition test

Many species of microorganisms produce biological compounds that can affect viruses. For example, spore-forming bacteria *Bacillus pumilus*, when grown in the optimum NEW medium, produce biologically active compounds characterized by antiviral activity against enteroviruses (poliovirus type 1, Coxsackie B virus (1–6), ECHO-3, and ECHO-6 [17]).

The test procedure was selected for ACOPB to assess its extracellular virucidal action *in vitro* toward SARS-CoV-2. Prior to that, it was found that ACOPB did not demonstrate any virucidal action *in vitro* toward 100 doses (2.5 lg PFU₅₀/0.2 ml SARS-CoV-2 with a virus titer of 4.55 lg PFU₅₀/0.2 ml).

The virus replication inhibition (VRI) test was performed using two 24-well plates with the Vero CCL-81 cell monolayer. One plate was used for the VRI test; the other plate was used for SARS-CoV-2 titration. The serum-free DMEM medium was used for twofold dilutions of ACOPB (dilutions from 1 : 2 to 1 : 32). SARS-CoV-2 was added to each dilution in the amount equal to 10 doses (3.5 lg TCD₅₀/0.2 ml or 3.55 lg PFU₅₀/0.2 ml at the virus titer of 4.5 lg TCD₅₀/0.2 ml and 4.55 PFU₅₀/0.2 ml). ACOPB interacted with the virus at 4°C for 2 hours, including regular shaking of ingredients. After the interaction was over, each dilution of the medication and virus mixture in the amount of 0.2 ml was dispensed into a 24-well plate, which was washed one time with Hanks' solution. Each dilution of the mixture was transferred into 4 wells of the plate, while 2 wells were designated for cell control and the other

2 wells — for control of 10 doses of the virus. The virus interacted with the cells in the incubator at 5% CO₂ for 1.5 hours; then, DMEM basal medium in the amount of 0.8 ml was added to all the wells in 24-well plates and the culturing continued. After the lytic cell destruction in the control well with 10 doses of the virus was detected (usually on the 2nd–3rd day after the infection), the results of the VRI test were assessed. The VRI test titer was expressed as the highest dilution of the medication, at which we observed 100% protection of cells against SARS-CoV-2.

Indirect membrane immunofluorescence assay

PBMCs were isolated from heparinized venous (20 U/ml) human blood using the Ficoll density gradient centrifugation (1.077 g/cm³) (PanEco) for 25 minutes at 1500 rpm. A cell fraction was selected and washed three times with pre-cooled phosphate-buffered saline; the remaining cells were resuspended in the DMEM/F12 medium with 2% FBS so that there were not less than 1 mln lymphocytes in each well. The suspension of lymphocytes in the amount of 1 ml was transferred into wells of 12-well plates.

Two hours before isolation of lymphocytes from venous blood, the equal amount of 10 doses of SARS-CoV-2 was added to 0.2 ml of twofold dilutions of ACOPB and left for interaction at 4°C, with regular shaking of the mixture.

Three dilutions (1 : 10, 1 : 20, and 1 : 40) of ACOPB in the amount of 0.1 ml and the ACOPB and SARS-CoV-2 mixture in the amount of 0.1 ml were dispensed into wells of 12-well plates with lymphocytes. Then, samples of lymphocytes were collected from the wells at different time intervals, starting from 1 hour, in the amount of 5 µl (3 samples per each time interval) and applied uniformly to chamber slides; the cell samples were left to dry out at room temperature overnight. Then, the samples were fixed with double-filtered 3% paraformaldehyde supplemented with 0.2% bovine serum albumin for 1 hour at room temperature. Then, they were washed two times with phosphate-buffered saline and were blocked in 10% normal goat serum for 1 hour. Mouse monoclonal anti-idiotypic antibodies for IFN-α/β and -γ were applied to each chamber with samples in the amount of 20 µl and incubated in the humidified chamber for 1 hour at 36.5°C in the thermostat. After the interaction with antibodies, double washing and drying, the working solution of anti-mouse FITC conjugate (BioRad) was applied to the samples. Then, they were incubated in the humidified chamber for 1 hour. Prior to its application, the FITC conjugate was diluted in 0.1% saponin solution with Hanks' solution and 0.01 M HEPES-buffered saline. After the interaction between the samples and the conjugate was over, the slides were washed twice with Hanks' solution and dried.

The expression level of R_{IFN}-α/β and -γ in PBMCs was measured using the Optica fluorescent microscope

(Italy) with 100X oil immersion objective and 10X eyepiece by the percentage of luminescent lymphocytes per 200 analyzed cells (repeated for each time interval).

VCF was treated according to E. Norrby [19]. Tween 80 diluted 1:10 was added to 100 ml of VCF in the amount of 2 ml. The mixture was shaken on ice for 5–10 minutes. Ether was added to the mixture in the amount equal to 1/2 of the volume of the mixture. The mixture was shaken for 15–20 minutes and then centrifuged for 20 minutes at 3000 rpm. After the centrifugation, the mixture separated into layers; the cloudy film at the top was carefully pierced with a pipette, trying not to stir it up, and the lower layer was aspirated. The solution was placed in a flask with a cotton-gauze plug to allow ether to evaporate and remained there for 24 hours at room temperature. Then, the hemagglutination titer of the antigen was measured; the solution was dispensed into vials (1.0 ml) and dried. The dried antigen can be stored in a refrigerator for several years without loss of activity. The culture liquid containing uninfected cells and prepared using the same technique was used as a control medium.

Statistical analysis of the data

The statistical significance of the obtained data was assessed using the Mann-Whitney U-test. The difference was considered significant at $p \leq 0.05$. The reliability was measured using the GraphPad Prism 4 software (Graph Red).

Safety requirements

All works involving SARS-CoV-2 were performed in compliance with the safety requirements applicable to handling hazard group 3 pathogens. All the employees working with the virus were briefed on safety precautions and have valid certificates for qualification in Bacteriology, Virology, Biological Safety, which were issued by the Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe” of Rospotrebnadzor.

Results

During the 1st stage of the study, we conducted tests checking for the presence or absence of hemagglutination properties of SARS-CoV-2 Dubrovka. HA was used to study hemagglutination properties of the virus toward chicken, mouse, guinea pig, and human red blood cells using the suspension of Vero CCL-81 cells infected with SARS-CoV-2 Dubrovka and VCF from the infected cells.

The results presented in **Table 1** clearly demonstrate the hemagglutination properties of SARS-CoV-2 Dubrovka in the infected cells and low titers in VCF, which can be explained by a low content of hemagglutinin or by non-specific masking of the phenomenon. The highest hemagglutination activity is manifested in the lysate of infected cells with guinea pig red blood cells.

The HA results show that Vero CCL-81 cell lines infected with SARS-CoV-2 Dubrovka contain viral hemagglutinin — one of the major viral proteins that are targets for antiviral agents.

For the VRI test, it is important to determine the dose of SARS-CoV-2 Dubrovka, which should be used with the ACOPB antiviral medication for VRI. The infectious dose of the virus was identified using the limiting dilution in Vero CCL-81 cell culture and the plaque assay with the same cell cultures.

Based on CPE, the SARS-CoV-2 titer was 4.50 lg TCD₅₀/0.2 ml; based on the plaque assay, it was 4.55 PFU₅₀/0.2 ml. The VRI test was performed using 10 doses of virus; the virus titer was 3.5 lg TCD₅₀/0.2 ml or 3.5 lg PFU₅₀/0.2 ml (**Fig. 1**).

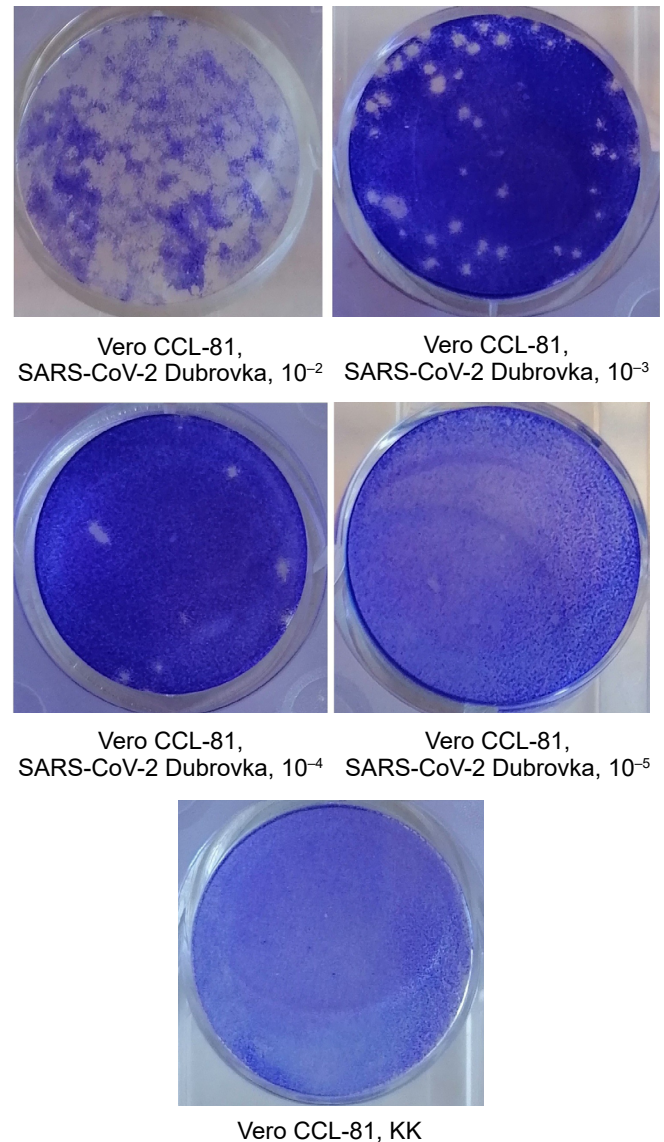
When interacting with 10 doses of SARS-CoV-2 Dubrovka, ACOPB had virus-inhibitory activity at 1 : 32 dilution, demonstrating 100% protection of cells during 8 days of culturing (the monitoring period).

To confirm the virus-inhibitory activity of ACOPB against SARS-CoV-2 Dubrovka, we conducted tests aimed to measure expression levels of R_{IFN-α/β} and -γ on membranes of human PBMCs. At the same time, this method was used to identify the genesis of the protective activity of bacterial antigens present in ACOPB. In these tests, mouse monoclonal anti-idiotypic antibodies mimicking biological properties of human IFN-α/β and -γ, i.e. anti-receptor antibodies were used as a highly specific marker.

Earlier, we found that when PBMCs were induced *in vitro* by ACOPB, the expression of R_{IFN-α/β} and -γ started more effectively at medication dilution of 1:10 or at 10 μg of the medication. Therefore, we decided to find the optimum dose of ACOPB, which would induce *in vitro* the highest expression of IFN-R on PBMC membranes.

Table 2 shows expression levels of R_{IFN-α/β} on human PBMCs, which were induced by different dilutions of the medication as well as by the mixture of ACOPB with 10 doses of SARS-CoV-2, after they interacted for 2 hours at +4°C prior to being dispensed into cultured lymphocytes.

The analysis of the expression of R_{IFN-α/β} induced on lymphocyte membranes by ACOPB shows (**Table 2**) that the most effective induction with all dilutions of the medication starts 6 hours after its beginning and



Plaque assay in the Vero CCL-81 cell monolayer infected with SARS-CoV-2 Dubrovka.

reaches the highest level 24–30 after its beginning, and then its level gradually decreases. It should be noted that all doses of the medication cause *in vitro* R_{IFN-α/β} induction on lymphocyte membranes, i.e. the synthesis of human IFN-α/β. Note that the maximum synthesis of IFN-α/β *in vitro* is reached at medication dilution of 1:20, i.e. at 5 μg of the medication.

Table 1. Hemagglutinating activity of SARS-CoV-2 Dubrovka

Studied specimens	Virus titer in HA with 0.25% suspension of red blood cells			
	chicken	mouse	guinea pig	human
Lysate of infected Vero CCL-81 cells	1 : 64	1 : 16	> 1 : 256	1 : 32
VCF from Vero CCL-81 cells	1 : 16	1 : 2	1 : 2	1 : 2
Uninfected Vero CCL-81 cells	0	0	0	0
Red blood cell control	0	0	0	0

Table 2. Expression of $R_{INF-\alpha\beta}$ (%) in human PBMCs induced *in vitro* by ACOPB and ACOPB with SARS-CoV-2 Dubrovka strain, hours

Induction time, hours	ACOPB dilution (dose)										Control (mean values) $R_{INF-\alpha}$		
	1 : 10 (10 мкг μg)			1 : 20 (5 мкг μg)			1 : 40 (2,5 μg)			decrease, %	decrease, %	human peripheral blood mononuclear cells	SARS-CoV-2
	ACOPB		ACOPB + SARS-CoV-2	ACOPB		ACOPB + SARS-CoV-2	ACOPB		ACOPB + SARS-CoV-2				
	ACOPB	ACOPB + SARS-CoV-2	decrease, %	ACOPB	ACOPB + SARS-CoV-2	decrease, %	ACOPB	ACOPB + SARS-CoV-2	decrease, %				
1	0.7 ± 0.001	0.4 ± 0.02	0.3*	0.5 ± 0.04	0.3 ± 0.01	0.2*	0.5 ± 0.03	0.2 ± 0.07	0.3*	0.60 ± 0.03	0.60 ± 0.05		
6	3.1 ± 0.05	2.6 ± 0.01	0.5*	4.1 ± 0.09	2.4 ± 0.04	1.7*	2.8 ± 0.1	2.0 ± 0.04	0.8*				
24	5.3 ± 0.07	3.8 ± 0.04	1.5*	7.8 ± 0.08	6.0 ± 0.07	1.8*	7.3 ± 0.01	5.0 ± 0.09	2.3*				
30	6.0 ± 0.09	5.0 ± 0.07	1.0*	10.0 ± 0.05	6.0 ± 0.05	4.0*	6.5 ± 0.04	5.0 ± 0.03	1.5*				
44	3.5 ± 0.01	2.5 ± 0.09	1.0*	8.0 ± 0.04	5.5 ± 0.07	2.5*	3.0 ± 0.03	2.5 ± 0.05	0.5*				
48	3.0 ± 0.08	2.0 ± 0.04	1.0*	5.0 ± 0.02	3.0 ± 0.04	2.0*	3.0 ± 0.05	2.0 ± 0.02	1.0*				
50	2.5 ± 0.01	2.0 ± 0.06	0.5*	4.5 ± 0.02	3.0 ± 0.03	1.5*	3.0 ± 0.05	1.5 ± 0.03	1.5*				

Note. * $p \leq 0.05$.

Table 3. Expression of $R_{INF-\gamma}$ (%) in human PBMCs induced *in vitro* by ACOPB and the ACOPB and SARS-CoV-2 Dubrovka strain mixture, hours

Induction time, hours	Разведение КАУПБ (доза) ACOPB dilution (dose)										Control (mean values) $R_{INF-\alpha}$		
	1 : 10 (10 μg)			1 : 20 (5 μg)			1 : 40 (2,5 μg)			decrease, %	decrease, %	human peripheral blood mononuclear cells	SARS-CoV-2
	ACOPB		ACOPB + SARS-CoV-2	ACOPB		ACOPB + SARS-CoV-2	ACOPB		ACOPB + SARS-CoV-2				
	ACOPB	ACOPB + SARS-CoV-2	decrease, %	ACOPB	ACOPB + SARS-CoV-2	decrease, %	ACOPB	ACOPB + SARS-CoV-2	decrease, %				
1	0.6 ± 0.07	0.6 ± 0.05	0	0.6 ± 0.04	0.8 ± 0.03	0	0.7 ± 0.02	0.6 ± 0.05	0.1*	0.57 ± 0.03	0.55 ± 0.03		
6	2.4 ± 0.01	2.4 ± 0.09	0	3.8 ± 0.05	3.2 ± 0.05	0.6*	3.4 ± 0.01	3.0 ± 0.07	0.4*				
24	4.5 ± 0.03	3.5 ± 0.01	1.0*	5.5 ± 0.02	4.5 ± 0.06	1.0*	4.8 ± 0.04	3.8 ± 0.03	1.0*				
30	6.5 ± 0.01	3.5 ± 0.09	3.0*	7.5 ± 0.05	3.5 ± 0.05	4.0*	4.0 ± 0.07	3.0 ± 0.04	1.0*				
44	4.5 ± 0.02	3.0 ± 0.03	1.0*	5.0 ± 0.01	3.5 ± 0.05	1.5*	4.0 ± 0.06	3.0 ± 0.01	1.0*				
48	3.5 ± 0.03	2.5 ± 0.02	1.0*	4.0 ± 0.07	2.5 ± 0.07	1.5*	3.5 ± 0.01	2.5 ± 0.05	1.0*				
50	3.0 ± 0.05	2.5 ± 0.09	0.5*	3.5 ± 0.04	2.5 ± 0.01	1.0*	3.0 ± 0.07	2.0 ± 0.06	1.0*				

Note. * $p \leq 0.05$.

The expression of $R_{\text{IFN}}-\alpha/\beta$ induced *in vitro* on lymphocyte membranes using the ACOPB and SARS-CoV-2 Dubrovka mixture starts decreasing 6 hours after the induction and continues throughout the study period (Table 2). The lowest expression level of $R_{\text{IFN}}-\alpha/\beta$ is reached 30 hours after the induction; the most effective decrease in the expression level is observed when lymphocytes are induced with the ACOPB and coronavirus mixture at 1:20 dilution or 5 μg ($p \leq 0.05$). The obtained results mean that ACOPB inhibits replication SARS-CoV-2 Dubrovka, neutralizing its infectivity. This conclusion was supported by the results of the VRI test performed with Vero CCL-81 cell culture susceptible to SARS-CoV-2 Dubrovka.

The above results clearly demonstrate that ACOPB is an effective immunomodulatory medication that also has a virus-inhibitory effect. This conclusion is confirmed by the data on the levels of $R_{\text{IFN}}-\gamma$ (Table 3). The expression level of $R_{\text{IFN}}-\gamma$, i.e. the synthesis of immune IFN by lymphocytes induced *in vitro* by ACOPB and by the mixture of the medication with SARS-CoV-2 Dubrovka involved the same mechanisms as the induction of $R_{\text{IFN}}-\alpha/\beta$. The analysis of the data presented in Table 3 shows that ACOPB used in the specified amounts can induce *in vitro* $R_{\text{IFN}}-\gamma$ expression on membranes of lymphocytes cultured *in vitro* 6 hours after the beginning of the induction, with the duration lasting up to 50 hours (the monitoring period). Active expression of $R_{\text{IFN}}-\gamma$ is observed from 24 hours to 44 hours from the induction by ACOPB; the highest induction is reached at concentrations of 10 and 5 μg . The expression of $R_{\text{IFN}}-\gamma$ decreases when lymphocytes are induced by ACOPB after it has interacted with SARS-CoV-2 Dubrovka for 2 hours, thus confirming virus-inhibitory activity of ACOPB.

Discussion

ACOPB is used for effective prevention and treatment of most of the chronic upper and lower respiratory tract diseases. It has been found that ACOPB has a protective effect against viral infections — influenza and

herpes virus infections. The COVID-19 pandemic triggered the need to find out whether this medication had a protective effect when administered for prevention and treatment of human coronavirus infection. For this purpose, we used the Russian strain of SARS-CoV-2 — Dubrovka isolated from a patient with COVID-19 and adapted to the Vero CCL-81 cell culture.

HA performed for Vero CCL-81 cell culture infected with SARS-CoV-2 Dubrovka strain detected a high titer of hemagglutinin, which is a target for antiviral agents, reaching over 1:256, and its low content in VCF.

To perform the VRI test with ACOPB, the exact titer of the virus must be determined. SARS-CoV-2 was titrated using two methods: the limiting dilution in Vero CCL-81 cell culture and the plaque assay with the same cell culture. The virus-inhibitory titer of ACOPB with 10 doses of SARS-CoV-2 was 1:32, demonstrating 100% protection of cells for 8 days (the monitoring period).

It was also important to find out what caused the protective effect of ACOPB. It is known that IFNs are required for implementation of the immune response to an antigenic stimulus, and that any antigen is an interferonogen [10]. Previously, we, using mouse monoclonal anti-idiotypic antibodies structurally mimicking human IFN- α/β and - γ , demonstrated that the infection-associated activation of the immune system was represented by expression of $R_{\text{IFN}}-\alpha/\beta$ and - γ in immunocompetent human cells [12, 13]. The indirect membrane immunofluorescence assay showed that when delivered *in vitro* into cultured human lymphocytes, ACOPB induced $R_{\text{IFN}}-\alpha/\beta$ and - γ , thus demonstrating its strong immunomodulatory effect.

When ACOPB interacts with 10 doses of SARS-CoV-2 Dubrovka strain for at least 2 hours and then is delivered into lymphocytes cultured *in vitro*, the expression level of $R_{\text{IFN}}-\alpha/\beta$ and - γ decreases. These findings suggest that ACOPB has a virus-inhibitory effect, and its protective effect is provided by endogenous IFN- α/β and - γ synthesized in the body.

REFERENCES

1. Akhmatova N.K. *Molecular and cellular mechanisms of action of immunomodulators of microbial origin on the functional activity of the effectors of innate immunity*: Diss. Moscow; 2006.
2. Pashenkov M.V., Pinegl B.V. Cell physiology of innate immune system: dendritic cells. *Immunology*. 2006;27(6):368–78. EDN: <https://www.elibrary.ru/hykkzd>
3. Egorova N.B., Kurbatova E.A., Akhmatova N.K., Semenova I.B. Protective activity of immunovacvp-4 vaccine against avian influenza virus H5N2 administered by different methods. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2011;88(1):49–53. EDN: <https://www.elibrary.ru/qbbzxs>
4. Egorova N.B., Kurbatova E.A., Semenova I.B. *Vaccines and Vaccination: National Guidelines*. Moscow; 2011:693–714.
5. Glad'ko O.V., Egorova N.B., Masyutova S.A., et al. Immunotherapy of genital herpes with a multicomponent VP-4 vaccine. *Military Medical Journal*. 2002;323(5):73–6.
6. Chuchalin A.G., Osipova G.L., Egorova N.B., et al. Controlled studies on the effectiveness of a multicomponent vaccine in immunotherapy in patients with chronic obstructive respiratory diseases. *Russian Pulmonology*. 1995;(2):55–61. EDN: <https://www.elibrary.ru/xctiqb>
7. Nemykina O.E., Egorova N.B., Shcherbakova B.V., et al. Optimization of treatment of atopic dermatitis with the help of immunotherapy. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2005;85(4):53–7. EDN: <https://www.elibrary.ru/ymzeiv>
8. Antonova L.P., Markova T.P., Kurbatova E.A. Application of polycomponent vaccine VP-4 by combined nasal-subcutaneous method in the treatment of patients with bronchial asthma and chronic obstructive bronchitis. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2004;84(6):36–40.
9. Nemykina O.E., Egorova N.B., Shcherbakova B.V., et al. Immunological characteristics in the therapy of atopic dermatitis in children with polycomponent vaccine Immunovac BII-4. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2005;85(5):45–9. EDN: <https://www.elibrary.ru/hsuwwp>
10. Hu B., Guo H., Zhou P., Shi Z.L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat. Rev. Microbiol.* 2021;19(3):141–54. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
11. Harrison A.G., Lin T., Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 transmission and pathogenesis. *Trends Immunol.* 2020;41(12):1100–5. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004>
12. Tu Y.F., Chien C.S., Yarmishyn A.A., et al. A review of SARS — CoV-2 and the ongoing clinical trials. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(7):2657. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21072657>
13. Gracheva A.V., Korchevaya E.R., Kudryashova A.M., et al. Adaptation of the MTT assay for detection of neutralizing antibodies against the SARS-CoV-2 virus. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2021;98(3):253–65. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-136> EDN: <https://www.elibrary.ru/jglvov>
14. Barkova E.P., Nagieva F.G., Kuznetsov V.P., et al. Expression of receptors for human interferons alpha and gamma on the surface of peripheral blood mononuclear cells in some viral infections. *Problems of Virology*. 1998;43(6):16–8. EDN: <https://www.elibrary.ru/wiapij>
15. Lisakov A.N., Nagieva F.G., Barkova E.P., et al. The immunocompetent cells receptors research under experimental influenza infection *in vitro*. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2015;5(3):273–8. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2015-3-273-278> EDN: <https://www.elibrary.ru/ukjgjj>
16. Shubladze A.K., Gaidamovich S.Ya. *A Short Course of Practical Virology*. Moscow; 1954:92–3.
17. Mikhaylova N.A., Nagieva F.G., Grinko O.M., Zverev V.V. Experimental study of antiviral activity of spore-forming bacterium *Bacillus pumilus* "Pashkov". *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2010;87(2): 69–74. EDN: <https://www.elibrary.ru/rurigl>
18. Bracci N., Pan H.C., Lehman C., et al. Improved plaque assay for human coronaviruses 229 E and OC43. *PeerJ*. 2020;8:e10639. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.10639>
19. Norrby E. Hemagglutination by measles virus. 4. A simple procedure for production of high potency antigen for hemagglutination-inhibition (HI) tests. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1962; 111:814–8. DOI: <https://doi.org/10.3181/00379727-111-27930>

Information about the authors

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

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

Ekaterina A. Kurbatova — D. Sci. (Med). Prof., Head, Laboratory of therapeutic vaccine, I. Mechnikov Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4474-7531>

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

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

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

Evgeny A. Pashkov — junior researcher, Laboratory of molecular immunology, Department of immunology and allergology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5682-4581>

Alexey N. Lisakov — researcher, Laboratory of hybrid cell cultures, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9374-5842>

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

Mariia B. Potapova — postgraduate student, Department of skin and venereal diseases named after V.A. Rakhmanov, Sechenov University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9647-1322>

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

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

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

The article was submitted 30.11.2022;
accepted for publication 12.02.2023;
published 28.04.2023

Информация об авторах

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

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

Курбатова Екатерина Алексеевна — д.м.н., проф., зав. лаб. терапевтических вакцин НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4474-7531>

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

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

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

Пашков Евгений Алексеевич — м.н.с. лаб. молекулярной иммунологии отдела иммунологии и аллергологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5682-4581>

Лисаков Алексей Николаевич — н.с. лаб. гибридных клеточных культур отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9374-5842>

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

Потапова Мария Борисовна — аспирант кафедры кожных венерических болезней им. В.А. Рахманова ПМГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9647-1322>

Файзулов Евгений Бахтиёрович — к.б.н., зав. лаб. молекулярной вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7385-5083>

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

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 30.11.2022;
принята к публикации 12.02.2023;
опубликована 28.04.2023



Antimicrobial resistance in foodborne *Salmonella enterica* isolates in the Republic of Belarus

Nina G. Kulikova^{1✉}, Alexey V. Chernyshkov¹, Yuliya V. Mikhaylova¹, Alexander L. Zenkovich², Daria A. Dovnar², Ala M. Mareyko², Lyutsiya A. Bityumina¹, Andrey A. Shelenkov¹, Anna E. Egorova¹, Stepan S. Saenko¹, Igor N. Manzeniuik¹

¹Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia;

²State Institution Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Minsk, Belarus

Abstract

Introduction. Antimicrobial resistance is a global public health concern. *Salmonella* spp., which can be transmitted to humans through contaminated food, are among the most important foodborne pathogens worldwide.

Materials and methods. The antimicrobial resistance of 358 bacterial isolates collected from food and water in the Republic of Belarus (Belarus) in 2018–2021 was studied by analyzing phenotypic and genotypic characteristics of antibiotic bacterial resistance. MALDI-TOF mass spectrometry was used to classify and identify bacteria. Phenotypic antimicrobial susceptibility of bacteria was measured by the minimum inhibitory concentration method using a Sensititre automated bacteriological analyzer and the disk diffusion test for 45 antimicrobial agents. Antimicrobial resistance genes in multidrug-resistant *Salmonella* isolates were identified by whole-genome sequencing.

Results. The *in vitro* testing of phenotypic bacterial susceptibility showed high susceptibility to fluoroquinolones (97.2%), third-generation cephalosporins (93.9%), carbapenems (98.0%), ampicillin (81.8%), aminoglycosides (97.5%), tetracyclines (87.5%), chloramphenicol (93.8%), trimethoprim/sulfamethoxazole (co-trimoxazole) (95.3%) and colistin (85.2%). It was found that the antibiotic resistance mechanism in *S. enterica* was associated with the presence of genes *bla*TEM-1B (82%), *bla*TEM-1C (7.7%), *bla*SHV-12 (2.6%), *bla*DHA-1 (2.6%), *bla*CMY-2 (7.7%), *qnr*B2 (9.1%), *qnr*B4 (9.1%), *qnr*B5 (9.1%), *qnr*B19 (72.7%), *aac*(6')-Ib-cr (9.1%), *aac*(6')-Iaa (100%), *aad*A1 (13.2%), *aad*A2 (8.8%), *tet*B (74.3%), *tet*A (25.7%), *tet*M (2.9%), *tet*D (28.6%), *mcr*-9 (1.5%).

Conclusion. All the bacterial isolates were phenotypically susceptible to first-line antibiotics used in treatment of salmonellosis: fluoroquinolones and third-generation cephalosporins. The whole-genome sequencing of multidrug-resistant *Salmonella* isolates (19.0%) detected resistance genes for 9 groups of antibiotics: aminoglycosides (100%), beta-lactams (57.4%), fluoroquinolones (16.2%), tetracyclines (51.5%), macrolides (1.5%), phenicols (30.4%), trimethoprim (13.0%), sulfonamides (47.8%) and colistin (1.4%). Thus, epidemiological surveillance of the *Salmonella* spread through the food chain is of critical importance for the monitoring of antimicrobial resistance among foodborne *Salmonella*.

Keywords: *Salmonella enterica*, antibiotic resistance, whole-genome sequencing, fluoroquinolones, salmonellosis

Funding source. The study was carried out as part of the implementation of the orders of Government of the Russian Federation No. 185-p of February 3, 2017 and No. 3116-p of December 21, 2019.

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

For citation: Kulikova N.G., Chernyshkov A.V., Mikhaylova Yu.V., Zenkovich A.L., Dovnar D.A., Mareyko A.M., Bityumina L.A., Shelenkov A.A., Egorova A.E., Saenko S.S., Manzeniuik I.N. Antimicrobial resistance in foodborne *Salmonella enterica* isolates in the Republic of Belarus. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2023;100(2):153–167.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-343> EDN: <https://www.elibrary.ru/mdnyzpz>

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-343>

Устойчивость к противомикробным препаратам пищевых изолятов *Salmonella enterica* на территории Республики Беларусь

Куликова Н.Г.¹✉, Чернышков А.В.¹, Михайлова Ю.В.¹, Зенькович А.Л.²,
Довнар Д.А.², Марейко А.М.², Битюмина Л.А.¹, Шеленков А.А.¹,
Егорова А.Е.¹, Саенко С.С.¹, Манзенюк И.Н.¹

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

²Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, Минск, Республика Беларусь

Аннотация

Введение. Устойчивость к противомикробным препаратам является глобальной проблемой здравоохранения. *Salmonella* spp., которые могут передаваться человеку через контаминированную пищевую продукцию, признаны важными патогенами пищевого происхождения во всём мире.

Материалы и методы. Исследования противомикробной резистентности 358 изолятов микроорганизмов из пищевых продуктов и воды, изолированных на территории Республики Беларусь в 2018–2021 гг., проводились путём изучения фенотипических и генотипических характеристик антибиотикорезистентности микроорганизмов. Таксономическое положение бактерий было идентифицировано методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. Фенотипическую чувствительность бактерий к антимикробным препаратам определяли методом минимальной подавляющей концентрации с помощью автоматизированного бактериологического анализатора «Sensititre» и диско-диффузионным методом к 45 противомикробным препаратам. Гены устойчивости к противомикробным препаратам у мультирезистентных изолятов сальмонелл определяли с помощью полногеномного секвенирования.

Результаты. Анализ фенотипической чувствительности бактерий *in vitro* показал высокую чувствительность к фторхинолонам (97,2%), цефалоспорином 3-го поколения (93,9%), карбапенемам (98,0%), ампициллину (81,8%), аминогликозидам (97,5%), тетрациклинам (87,5%), хлорамфениколу (93,8%), триметоприм/сульфаметоксазолу (ко-тримоксазолу) (95,3%) и колистину (85,2%). Показано, что механизм резистентности к антибиотикам у *S. enterica* был ассоциирован с наличием генов *bla*TEM-1B (82%), *bla*TEM-1C (7,7%), *bla*SHV-12 (2,6%), *bla*DHA-1 (2,6%), *bla*CMY-2 (7,7%), *qnrB2* (9,1%), *qnrB4* (9,1%), *qnrB5* (9,1%), *qnrB19* (72,7%), *aac(6)-Ib-cr* (9,1%), *aac(6)-Iaa* (100%), *aadA1* (13,2%), *aadA2* (8,8%), *tetB* (74,3%), *tetA* (25,7%), *tetM* (2,9%), *tetD* (28,6%), *mcr-9* (1,5%).

Заключение. Все изоляты микроорганизмов были фенотипически высокочувствительны к препаратам 1-й линии в терапии сальмонеллёза: фторхинолонам и цефалоспорином 3-го поколения. Результаты полногеномного секвенирования мультирезистентных изолятов сальмонелл (19,0%) выявили гены устойчивости к 9 группам антибиотиков: аминогликозидам (100%), бета-лактамам (57,4%), фторхинолонам (16,2%), тетрациклинам (51,5%), макролидам (1,5%), фениколам (30,4%), триметоприму (13,0%), сульфаниламидам (47,8%) и колистину (1,4%). Таким образом, для контроля устойчивости к противомикробным препаратам среди сальмонелл пищевого происхождения решающее значение имеет эпидемиологический надзор за их распространением в цепи пищевых продуктов.

Ключевые слова: *Salmonella enterica*, антибиотикорезистентность, полногеномное секвенирование, фторхинолоны, сальмонеллез

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках реализации распоряжений Правительства РФ № 185-р от 03.02.2017 и № 3116-р от 21.12.2019

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

Для цитирования: Куликова Н.Г., Чернышков А.В., Михайлова Ю.В., Зенькович А.Л., Довнар Д.А., Марейко А.М., Битюмина Л.А., Шеленков А.А., Егорова А.Е., Саенко С.С., Манзенюк И.Н. Устойчивость к противомикробным препаратам пищевых изолятов *Salmonella enterica* на территории Республики Беларусь. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(2):153–167.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-343>

EDN: <https://www.elibrary.ru/mdnyzp>

Introduction

Among all foodborne pathogens, the leading role in bacterial invasion into the gastrointestinal tract belongs to different *Salmonella enterica* serovars [1]. *Salmonella* invasion in humans poses a great threat due to the ability of *Salmonella* to cause persistent infection and complications [2]. Having high environmental plasticity, *S. enterica* species can easily find ecological niches, adapt to different conditions, and remain viable in dry and frozen food products [1, 2]; they can also adapt to mass drug administration of antibiotics in public health and agriculture, thus contributing to increasing resistance to antimicrobial agents.

Drug resistance mechanisms of bacteria depend on different enzyme-mediated factors [3]. Considering that *Salmonella* spp. can act as a vector of transfer of resistance genes to other microorganisms, the studies of phenotypic and genotypic resistance profiles of *Salmonella* are highly important for monitoring of spread of antibiotic resistance.

Materials and methods

Collection of microorganisms

The study was performed using *S. enterica* cultures ($n = 358$) isolated in Belarus in 2018–2021. The isolation and primary identification of bacterial isolates were performed at the Republican Center of Hygiene, Epidemiology and Public Health (Minsk).

The sources of bacterial isolates were poultry ($n = 113$), meat ($n = 52$), fish ($n = 1$), dairy ($n = 2$), confectionery ($n = 3$), precooked and processed ($n = 158$) products, wastewater and washings collected from work surfaces ($n = 29$). The final species-level identification of bacterial isolates and assessment of their antimicrobial susceptibility were performed at the Rospotrebnadzor Reference Center for Monitoring the Residual Amount of Antibiotics and Antibiotic Resistance of Bacteria in Food Raw Materials and Food Products at the Rospotrebnadzor Central Research Institute of Epidemiology (Moscow).

Species-level identification and storage of bacterial isolates

All the studied bacterial isolates were identified to the genus level using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), the Microflex LT system and the MALDI Biotyper Compass v.4.1.80 software (Bruker Daltonics). The recommended score of ≥ 2.0 was used as a criterion for accurate species-level identification with MALDI-TOF mass-spectrometry. Serotyping of *Salmonella* was performed using the *Salmonella* sera agglutination test (PETSAL) in accordance with the Kauffmann–White classification scheme. Bacterial isolates were stored at -70°C in Mueller–Hinton agar with 10% glycerol [4].

Assessment of susceptibility to antimicrobial agents

Antimicrobial susceptibility profiles of foodborne bacterial isolates obtained in 2018–2019 were evaluated using the disk diffusion method and the following antibiotics: ampicillin, cefotaxime, ceftazidime, meropenem, ciprofloxacin, levofloxacin, amikacin, gentamicin, chloramphenicol and co-trimoxazole. Clinical categories of antimicrobial susceptibility of bacterial isolates were identified with reference to the breakpoints for the minimum inhibitory concentration in accordance with the EUCAST guidelines (versions 8.0, 2018 and 9.0, 2019, respectively).

The antimicrobial susceptibility profiling of foodborne bacterial isolates collected in 2020–2021 was performed by microdilution in the Mueller–Hinton agar and measuring the minimum inhibitory concentration using a Sensititre semi-automated analyzer (TREK Diagnostics Systems). Bacterial inoculation was performed using 96-well RUGNF and GN4F microplates for gram-negative bacterial isolates. The test results for antimicrobial susceptibility of bacterial isolates from raw foods and food products were analyzed using the SWIN software in accordance with the CLSI interpretation guidelines (30th edition, 2020) and/or EUCAST (versions 10.0, 2020 and 11.0, 2021, respectively). *E. coli* ATCC25922 and *E. coli* ATCC35218 cultures were used for susceptibility assessment quality control.

Detection of genetic resistance determinants

The determinants of genetic resistance in multi-drug-resistant *Salmonella* isolates were detected using whole-genome sequencing. The RIBO-prep reagent kit (Central Research Institute of Epidemiology) was used for DNA extraction. Samples for DNA sequencing were prepared using the Illumina Nextera DNA Library Prep Kit and Illumina Nextera Index Kit. The sequencing was performed with the Illumina HiSeq1500 system (Illumina), including Illumina HiSeq PE Rapid Cluster Kit v2 and Illumina HiSeq Rapid SBS Kit v2 reagent kits.

Bioinformatic analysis

Genome assemblies from short reads were obtained using SPAdes v. 3.12 [5] with default parameters. The assembly quality assessment, completeness evaluation and initial annotation were performed using the software that was described earlier [6]. The Resfinder 4.0 database [7], including default parameters, was used for *in silico* identification of antibiotic-resistance genes; typing of bacterial isolates was performed using the multilocus sequence typing (MLST) scheme and Pasteur MLST website¹, as of 20/10/2021).

Statistical analysis of the results

Standard methods of descriptive statistics and Microsoft Office Excel 2010 were used for the statistical

¹ URL: <https://bigsd.b.pasteur.fr/>

analysis of the study results. The statistical significance of differences in percentages of resistant cultures was assessed using Student's t-test and the threshold value $\alpha < 0.05$.

Results

A total of 358 *S. enterica* isolates from raw foods and food products in Belarus were studied in 2018–2021. Most of the cultures were delivered for further studies to the Rospotrebnadzor Reference Center in 2018 ($n = 121$; $33.8 \pm 0.29\%$); the smallest percentage of cultures were delivered in 2021 ($n = 43$; $12.0 \pm 0.14\%$). In 2019 and 2020, the Reference Center received 104 ($29.1 \pm 0.27\%$) and 90 ($25.1 \pm 0.24\%$) bacterial isolates, respectively.

Most of the cultures were isolated from meat products ($n = 52$), poultry products ($n = 113$) and precooked products from processed pork and poultry ($n = 158$) (Table 1). The smallest number of *Salmonella* was isolated from confectionary, dairy and fish products. In addition to food products, *Salmonella* bacteria were isolated from drinking water, wastewater and washings collected from work surfaces, which were classified as other products ($n = 29$).

A total of 28 serotypes of *S. enterica* were identified during the studies. Serotype *Enteritidis* isolates accounted for the highest percentage ($n = 182$; $50.80 \pm 0.20\%$): In 2018, they accounted for $57.10 \pm 0.27\%$ ($n = 68$), in 2019 — $41.30 \pm 0.22\%$ ($n = 43$), in 2020 — $58.9 \pm 0.27\%$ ($n = 53$), in 2021 — $41.90 \pm 0.12\%$ ($n = 18$) (Fig. 1). From $3.30 \pm 0.12\%$ ($n = 3$) in 2020 to $14.30 \pm 0.56\%$ ($n = 17$) of *Salmonella* bacteria in 2018 belonged to serotype *Typhimurium* ($n = 61$; $17.00 \pm 0.15\%$). All the other serotypes were represented by the smallest percentage (from $0.30 \pm 0.01\%$ to $2.50 \pm 0.06\%$), and therefore were assigned to the group of "other", which included from $13.40 \pm 0.16\%$ to $29.80 \pm 0.25\%$ of cultures. The cultures in this group belonged to serotypes *Agona*, *Blegdam*, *Brandenburg*, *Bredeney*, *Chester*, *Derby*, *Dublin*, *Essen*, *Fyris*, *Give*, *Goettingen*, *Goma*, *Infantis*, *Jerusalem*, *Kapamba*, *Kottbus*, *London*, *Mbandaka*, *Munchen*, *Panama*, *Saintpaul*, *Sandiego*, *Tsevie*, *Virchow*.

Table 1. *Salmonella* content level in food products

Source	Number of isolates	Number of isolates, %
Cookery food	158	44.1 ± 0.28
Poultry	113	31.6 ± 0.24
Meat	52	14.5 ± 0.14
Confectionery	3	0.8 ± 0.06
Dairy	2	0.6 ± 0.05
Seafood	1	0.3 ± 0.04
Others	29	8.1 ± 0.1

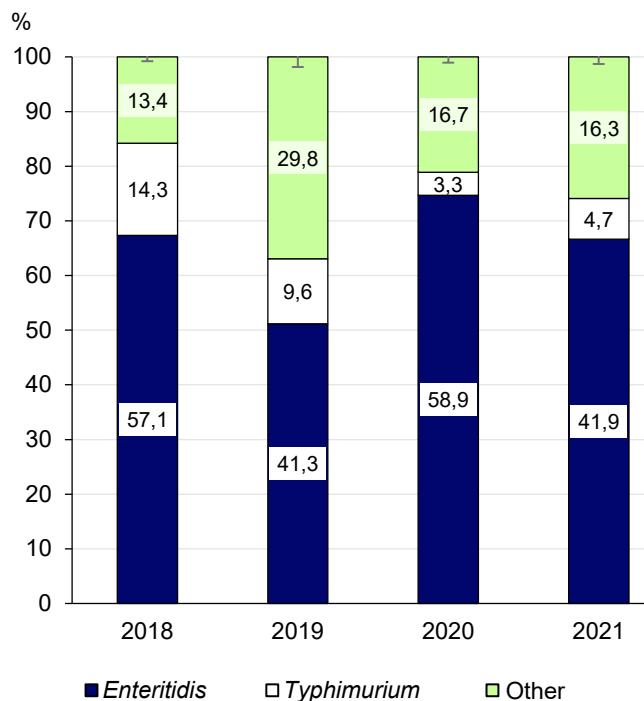


Fig. 1. Prevalence of foodborne *S. enterica* serotypes isolated in Belarus.

During the studies in 2018–2021, the analyzed data on phenotypic susceptibility of *Salmonella* isolates to 45 antibacterial agents showed high susceptibility of bacteria to these agents ($76.90 \pm 0.06\%$). Multidrug resistance (MDR) was found in $19.00 \pm 0.05\%$ ($n = 68$) of cultures.

The main medications for treatment of severe salmonellosis are fluoroquinolone antibiotics that have no cross-resistance with other classes of antibiotics due to their antimicrobial activity induced by inhibition of DNA gyrase or topoisomerase IV [8]. The analysis of phenotypic susceptibility of *Salmonella* bacteria isolated from food products and raw foods in Belarus demonstrated high susceptibility of bacteria to this group of antibiotics (from $88.40 \pm 0.31\%$ to 100%). However, the period of 2020–2021 demonstrated a tendency towards a gradual annual increase in the percentage of resistant *S. enterica* isolates: from 0% in 2018 and 2019 to $5.6 \pm 0.1\%$ and $11.60 \pm 0.31\%$ in 2020 and 2021, respectively (Fig. 2).

The analysis of phenotypic susceptibility of *Salmonella* showed the tendency towards decreasing activity of third-generation cephalosporins, though the percentage of phenotypically susceptible cultures remained high: from 100% in 2018 to $83.70 \pm 0.14\%$ in 2021 (Fig. 3). At the same time, the annual increase in phenotypically resistant *Salmonella* cultures was observed throughout the period of studies.

During the period of studies, *S. enterica* isolates were phenotypically highly susceptible to such reserve antibiotics for salmonellosis treatment as ampicillin

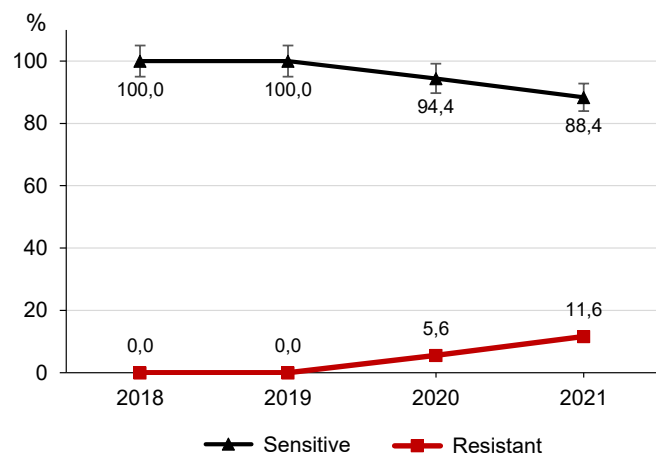


Fig. 2. Profile of phenotypic susceptibility *S. enterica* isolates to fluoroquinolones.

and carbapenems — imipenem and meropenem. Regarding ampicillin, there was a general trend towards a gradual increase in the percentage of resistant cultures from $14.9 \pm 0.1\%$ in 2018 to $23.30 \pm 0.55\%$ in 2021; as for carbapenems, the percentage of resistant cultures increased to $5.60 \pm 0.11\%$ in 2020 compared to 2018 and 2019; then, it slightly decreased to $4.70 \pm 0.14\%$ in 2021.

Antibiotics from the group of aminoglycosides are of primary clinical significance in treatment of nosocomial infections caused by aerobic gram-negative bacteria. The studies of phenotypic aminoglycoside susceptibility of *S. enterica* cultures isolated from food products in Belarus demonstrated high phenotypic susceptibility to aminoglycosides during the entire period of monitoring: from $95.30 \pm 0.06\%$ to 100.0% . However, in 2020–2021, the percentage of resistant cultures increased gradually to $3.30 \pm 0.07\%$ and $4.70 \pm 0.15\%$, respectively (Fig. 4).

In 2020 and 2021, the isolated *Salmonella* cultures were assessed for their susceptibility to colistin and tetracyclines as reserve antibiotics against multidrug resistant microorganisms. Colistin remains a drug of

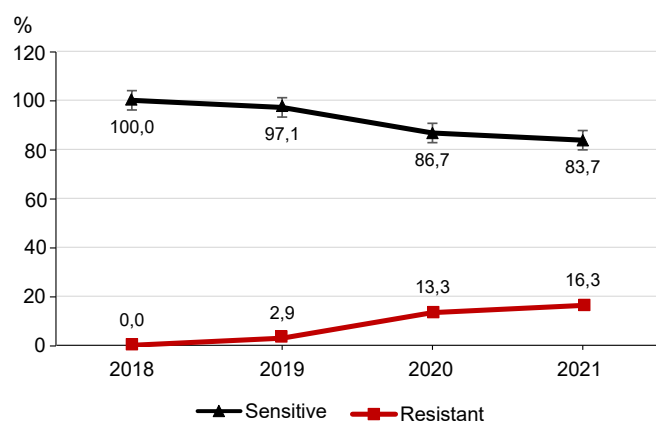


Fig. 3. Profile of phenotypic susceptibility of *S. enterica* isolates to third-generation cephalosporins.

last resort, being used for treatment of life-threatening infections caused by carbapenem-resistant enterobacteria. Some countries and regions have already reported the existence of colistin-resistant bacteria causing infections, against which there are no effective antibiotics [9]. Our study revealed an upward trend in phenotypically colistin-resistant bacterial isolates, the percentage of which increased 2.3 times (from $10.10 \pm 0.18\%$ in 2020 to $23.30 \pm 0.58\%$ in 2021), and in tetracycline-resistant isolates, the percentage of which increased 7.2 times (from $3.9 \pm 0.1\%$ in 2020 to $27.90 \pm 0.65\%$ in 2021; Fig. 5). Broad-spectrum reserve antibiotics are represented by co-trimoxazole and chloramphenicol, which were characterized by a low percentage of resistant cultures throughout the monitoring period: from 4.8 ± 0.1 to $6.70 \pm 0.13\%$ and $3.80 \pm 0.07\%$ to $7.4 \pm 0.12\%$, respectively.

The severity of *Salmonella* infection depends on multiple factors, including the presence of antimicrobial resistance determinants in bacteria [10]. In 2018–2021, in Belarus, a total of 68 ($19.0 \pm 0.2\%$) multidrug-resistant *Salmonella* isolates were identified and were further studied for genetic markers of resistance. The main mechanism of resistance to beta-lactam antibiotics in *Salmonella* spp. involves acquisition of *bla* genes, which encode enzymes capable of inactivating antibiotics [11]. Although the percentage of cultures phenotypically resistant to beta-lactam antibiotics is small, the genotypic profile of resistance of bacterial isolates showed a high percentage of producers of Class A and C beta-lactamases ($n = 39$; $57.4 \pm 0.2\%$). Most of the bacterial isolates contained extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) *bla*TEM-1B ($n = 32$; $82.10 \pm 0.16\%$), *bla*TEM-1C ($n = 3$; $7.70 \pm 0.26\%$), *bla*SHV-12 ($n = 1$; $2.60 \pm 0.11\%$), *bla*DHA-1 ($n = 1$; $2.60 \pm 0.11\%$); in addition, isolates of serotype *Enteritidis* were detected, which contained cephalosporinases *bla*CMY-2 ($n = 3$; $7.70 \pm 0.26\%$; Table 2).

The analysis of the genotypic susceptibility profile of MDR *Salmonella* revealed the presence of fluoroquinolone resistance determinants in 11 isolates

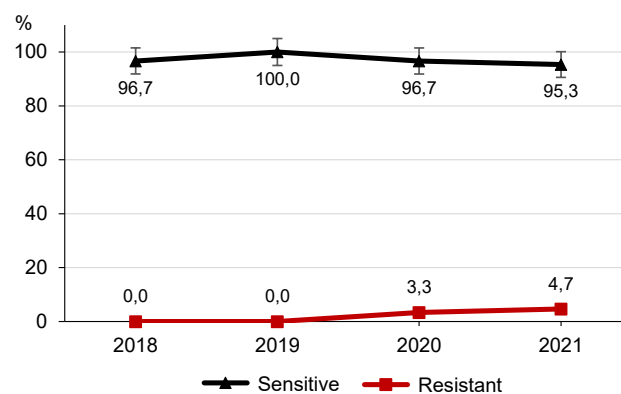


Fig. 4. Profile of phenotypic susceptibility of *S. enterica* isolates to aminoglycoside antibiotics.

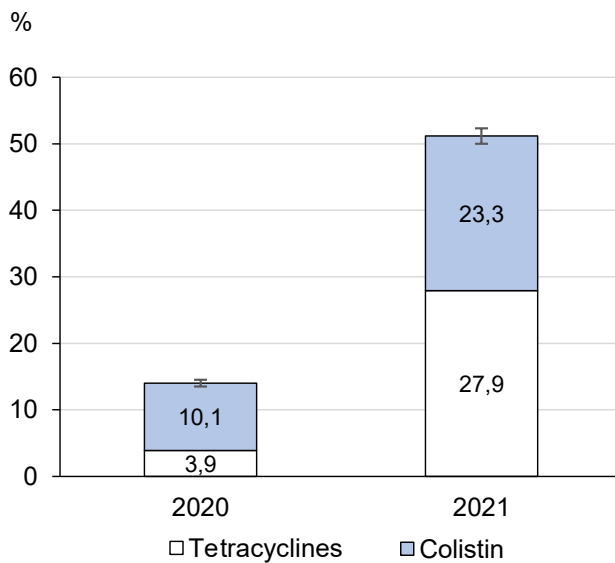


Fig. 5. Changes in the percentage of *S. enterica* cultures phenotypically resistant to colistin and tetracycline in 2020–2021

($16.20 \pm 0.33\%$), which were encoded by *qnrB2* ($n = 1$; $9.10 \pm 0.69\%$), *qnrB4* ($n = 1$; $9.10 \pm 0.69\%$), *qnrB5* ($n = 1$; $9.10 \pm 0.69\%$), *qnrB19* ($n = 8$; $72.70 \pm 0.12\%$) genes and aminoglycoside acetyltransferase enzyme *aac(6')-Ib-cr* ($n = 1$; $9.10 \pm 0.69\%$), causing simultaneous inactivation of fluoroquinolones and aminoglycosides (**Table 3**).

Despite the high percentage of cultures phenotypically susceptible to aminoglycosides, the whole-genome sequencing showed that resistance determinants for this group of agents were present in all the studied MDR-cultures, including *Salmonella*, which demonstrated phenotypic susceptibility to aminoglycosides ($n = 61$; $89.70 \pm 0.08\%$). The dominant resistance gene detected in all the bacterial isolates was *aac(6')-Iaa* ($n = 68$; 100%). The main genetic markers of resistance to aminoglycosides, which were identified in our studies, were *aadA1* genes ($n = 9$; $13.20 \pm 0.28\%$) and *aadA2* genes ($n = 6$; $8.8 \pm 0.2\%$).

Mobilized colistin resistance (*mcr*) genes were found only in one MDR-culture — Crie F1151, which was phenotypically susceptible to colistin. No *mcr* genes were detected in cultures phenotypically resistant to colistin. Genetic determinants of tetracycline resistance were detected in $51.5 \pm 0.2\%$ ($n = 35$) of *Salmonella* bacteria (**Table 4**). The resistance mechanisms involved genes encoding efflux pumps of the cytoplasmic membrane: *tetB* ($n = 26$; $74.30 \pm 0.65\%$), *tetA* ($n = 9$; $25.70 \pm 0.67\%$), *tetD* ($n = 10$; $28.60 \pm 0.71\%$); the studied cultures also had the tetracycline resistance gene *tetM* ($n = 1$; $2.90 \pm 0.15\%$) protecting the target from tetracycline action.

The analysis of the results of our genotypic studies of MDR *Salmonella* cultures showed that $29.4 \pm 0.51\%$ ($n = 20$) of them had plasmid-mediated efflux pumps

genes *cmlA1* ($n = 4$; $20.00 \pm 0.83\%$) and *floR* ($n = 11$; $55.00 \pm 1.13\%$) responsible for resistance to phenicols as well as genes encoding chloramphenicol acetyltransferase enzyme – *catA1* ($n = 5$; $25.00 \pm 0.92\%$) and *catA2* ($n = 1$; $5.00 \pm 0.25\%$; **Table 5**).

Co-trimoxazole resistance determinants were detected in $50.0 \pm 0.2\%$ ($n = 34$) of MDR cultures with the genotypic profile of resistance being represented by dihydrofolate reductase genes *dfrA1* ($n = 2.00 \pm 0.18$; 5.9%), *dfrA8* ($n = 2.00 \pm 0.18$; 5.9%), *dfrA12* ($n = 3.00 \pm 0.27$; 8.8%) and *dfrA14* ($n = 2.00 \pm 0.18$; 5.9%) and by genes ($n = 33$; $48.50 \pm 0.59\%$) expressing dihydropteroate synthases resistant to sulfonamides – *sulI* ($n = 6$; $18.2 \pm 0.59\%$), *sul2* ($n = 23$; $69.7 \pm 0.74\%$) and *sul3* ($n = 4$; $12.1 \pm 0.36\%$; **Table 6**).

Note that despite the presence of antibiotic resistance determinants, 10 cultures were susceptible to all the studied antibiotics – Crie F146, Crie F149, Crie F158, Crie F159, Crie F162, Crie F163, Crie F164, Crie F165, Crie F167 and Crie F168. In addition, in our study, we did not detect carbapenemases of class A (KPC) and class B (GIM, VIM, IMP, NDM, SPM and FOX).

Almost all *Salmonella* cultures producing ESBLs or AmpC ($n = 20$; $51.30 \pm 0.27\%$) were characterized by complete phenotypic susceptibility to other, non-beta-lactam antibiotics, including fluoroquinolones; $46.20 \pm 0.27\%$ ($n = 18$) of bacterial isolates were resistant to 1–2 non-lactam antibiotics.

The in silico multilocus sequence typing analysis revealed 10 different sequence types of MDR *S. enterica* isolates: serovar *Enteritidis* ST11 ($n = 31$; $47.0 \pm 0.57\%$), serovar *Typhimurium* ST34 and ST19 ($n = 21$; $33.30 \pm 0.51\%$ and $n = 3$; $4.50 \pm 0.10\%$, respectively), serovar *Infantis* ST32 ($n = 4$; $6.10 \pm 0.13\%$), serovar *Mendoza* ST490 ($n = 3$; $4.50 \pm 0.10\%$), serovar *Bredeney* ST897 ($n = 1$; $1.50 \pm 0.03\%$), serovar *Virchow* ST8662 ($n = 1$; $1.50 \pm 0.03\%$), serovar *London* ST1992 ($n = 1$; $1.00 \pm 0.03\%$), serovar *Stanleyville* ST1986 ($n = 1$; $1.00 \pm 0.03\%$). The new sequence type, ST9644, was identified in Crie F46 and Crie F158 *Salmonella* cultures. Dominant sequence types ST11, ST34, ST32, ST490 and ST19 were associated with multidrug resistance of the cultures that contained resistance determinants to 7 classes of antibiotics (Tables 2–6), while sequence types ST897, ST1992 and ST1986 contained genes responsible for resistance only to aminoglycosides.

The Crie F1151 culture was isolated from processed and precooked food products; it taxonomically belonged to *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium*. The culture was characterized by phenotypic multidrug resistance to penicillins, cephalosporins, aztreonam, fluoroquinolones, aminoglycosides, trimethoprim/sulfamethoxazole and tetracyclines encoded by the respective resistance determinants: *aac(6')-IIc*, *aac(6')-Iaa*, *aadA1*, *aph(3')-Ia*, *blaDHA-1*, *blaSHV-12*,

Table 2. Genotypic profile of beta-lactam antibiotic resistance of *S. enterica* isolates

Year	Isolate	Serotype	MLST	Resistance genes				
				<i>bla</i> TEM-1B	<i>bla</i> TEM-1C	<i>bla</i> CMY-2	<i>bla</i> DHA-1	<i>bla</i> SHV-12
2018	Crie F21	<i>Enteritidis</i>	ST11	+	-	-	-	-
2018	Crie F28	<i>Typhimurium</i>	ST34	+	-	-	-	-
2018	Crie F47	<i>Enteritidis</i>	ST11	-	+	-	-	-
2018	Crie F34	<i>Mendoza</i>	ST490	+	-	-	-	-
2018	Crie F50	<i>Typhimurium</i>	ST34	+	-	-	-	-
2018	Crie F40	<i>Typhimurium</i>	ST34	+	-	-	-	-
2018	Crie F51	<i>Enteritidis</i>	ST11	-	+	-	-	-
2018	Crie F297	<i>Enteritidis</i>	ST11	+	-	-	-	-
2018	Crie F46	<i>Typhimurium</i>	ST9644	+	-	-	-	-
2018	Crie F36	<i>Typhimurium</i>	ST34	+	-	-	-	-
2018	Crie F37	<i>Typhimurium</i>	ST34	+	-	-	-	-
2018	Crie F303	<i>Enteritidis</i>	ST11	+	-	-	-	-
2019	Crie F146	<i>Enteritidis</i>	ST11	+	-	-	-	-
2019	Crie F296	<i>Typhimurium</i>	ST19	+	-	-	-	-
2019	Crie F149	<i>Typhimurium</i>	ST34	+	-	-	-	-
2019	Crie F158	<i>Brandenburg</i>	ST9644	+	-	-	-	-
2019	Crie F298	<i>Mendoza</i>	ST490	+	-	-	-	-
2019	Crie F159	<i>Enteritidis</i>	ST11	-	+	-	-	-
2019	Crie F162	<i>Enteritidis</i>	ST11	+	-	-	-	-
2019	Crie F163	<i>Enteritidis</i>	ST11	+	-	-	-	-
2019	Crie F164	<i>Typhimurium</i>	ST34	+	-	-	-	-
2019	Crie F165	<i>Typhimurium</i>	ST34	+	-	-	-	-
2019	Crie F167	<i>Typhimurium</i>	ST34	+	-	-	-	-
2019	Crie F168	<i>Typhimurium</i>	ST34	+	-	-	-	-
2019	Crie F302	<i>Enteritidis</i>	ST11	-	-	+	-	-
2019	Crie F353	<i>Typhimurium</i>	ST34	+	-	-	-	-
2020	Crie F919	<i>Typhimurium</i>	ST34	+	-	-	-	-
2020	Crie F920	<i>Typhimurium</i>	ST34	+	-	-	-	-
2020	Crie F923	<i>Enteritidis</i>	ST11	-	-	+	-	-
2020	Crie F926	<i>Enteritidis</i>	ST11	-	-	+	-	-
2021	Crie F1149	<i>Typhimurium</i>	ST34	+	-	-	-	-
2021	Crie F1151	<i>Typhimurium</i>	ST34	-	-	-	+	+
2021	Crie F1153	<i>Typhimurium</i>	ST34	+	-	-	-	-
2021	Crie F1154	<i>Typhimurium</i>	ST34	+	-	-	-	-
2021	Crie F1155	<i>Typhimurium</i>	ST34	+	-	-	-	-
2021	Crie F1156	<i>Typhimurium</i>	ST34	+	-	-	-	-
2021	Crie F1157	<i>Typhimurium</i>	ST34	+	-	-	-	-
2021	Crie F1159	<i>Typhimurium</i>	ST34	+	-	-	-	-

Table 3. Genotypic profile of resistance of *S. enterica* to fluoroquinolones

Year	Isolate	Serotype	MLST	Resistance genes				
				<i>qnrB2</i>	<i>qnrB4</i>	<i>qnrB5</i>	<i>qnrB19</i>	<i>aac(6)-Ib-cr</i>
2018	Crie F46	<i>Tythimurium</i>	ST9644	-	-	-	+	-
2019	Crie F298	<i>Mendoza</i>	ST490	+	-	-	-	-
2019	Crie F353	<i>Tythimurium</i>	ST34	-	-	-	+	-
2020	Crie F920	<i>Tythimurium</i>	ST34	-	-	-	+	-
2020	Crie F921	<i>Infantis</i>	ST32	-	-	-	+	-
2020	Crie F922	<i>Enteritidis</i>	ST11	-	-	-	+	-
2020	Crie F925	<i>Enteritidis</i>	ST11	-	-	-	+	-
2020	Crie F926	<i>Enteritidis</i>	ST11	-	-	-	+	-
2021	Crie F1149	<i>Tythimurium</i>	ST34	-	-	+	-	-
2021	Crie F1151	<i>Tythimurium</i>	ST34	-	+	-	-	+
2021	Crie F1159	<i>Tythimurium</i>	ST34	-	-	-	+	-

Table 4. Genotypic profile of *S. enterica* resistance to chloramphenicol

Year	Isolate	Serotype	MLST	Resistance genes			
				<i>cmIA1</i>	<i>floR</i>	<i>catA1</i>	<i>catA2</i>
2018	Crie F21	<i>Enteritidis</i>	ST11	+	-	-	-
2018	Crie F28	<i>Tythimurium</i>	ST34	-	+	-	-
2018	Crie F29	<i>Enteritidis</i>	ST11	-	-	+	-
2018	Crie F40	<i>Tythimurium</i>	ST34	-	+	-	-
2018	Crie F299	<i>Enteritidis</i>	ST11	-	-	+	-
2018	Crie F36	<i>Tythimurium</i>	ST34	-	+	-	-
2018	Crie F37	<i>Tythimurium</i>	ST34	-	+	-	-
2018	Crie F303	<i>Enteritidis</i>	ST11	+	-	-	-
2019	Crie F146	<i>Enteritidis</i>	ST11	+	-	-	-
2019	Crie F149	<i>Tythimurium</i>	ST34	-	+	-	-
2019	Crie F298	<i>Mendoza</i>	ST490	-	+	-	-
2019	Crie F352	<i>Enteritidis</i>	ST11	-	-	+	-
2019	Crie F164	<i>Tythimurium</i>	ST34	-	+	-	-
2019	Crie F165	<i>Tythimurium</i>	ST34	-	+	-	-
2019	Crie F168	<i>Tythimurium</i>	ST34	-	+	-	-
2019	Crie F170	<i>Enteritidis</i>	ST11	-	-	+	-
2019	Crie F171	<i>Tythimurium</i>	ST34	-	-	+	-
2020	Crie F919	<i>Tythimurium</i>	ST34	+	+	-	-
2020	Crie F920	<i>Tythimurium</i>	ST34	-	+	-	-
2021	Crie F1151	<i>Tythimurium</i>	ST34	-	-	-	+

Table 5. Genotypic profile of *S. enterica* resistance to tetracyclines

Year	Isolate	Serotype	MLST	Resistance genes			
				<i>tetB</i>	<i>tetA</i>	<i>tetM</i>	<i>tetD</i>
2018	Crie F28	<i>Tythimurium</i>	ST34	+	–	–	–
2018	Crie F29	<i>Enteritidis</i>	ST11	–	+	–	–
2018	Crie F34	<i>Mendoza</i>	ST490	+	–	–	–
2018	Crie F50	<i>Tythimurium</i>	ST34	+	–	–	–
2018	Crie F40	<i>Tythimurium</i>	ST34	+	–	–	–
2019	Crie F296	<i>Tythimurium</i>	ST19	–	+	–	–
2019	Crie F147	<i>Infantis</i>	ST32	–	+	–	–
2019	Crie F149	<i>Tythimurium</i>	ST34	+	–	–	–
2019	Crie F158	<i>Brandenburg</i>	ST9644	+	–	–	–
2019	Crie F298	<i>Mendoza</i>	ST490	+	–	–	–
2019	Crie F352	<i>Enteritidis</i>	ST11	–	+	–	–
2019	Crie F164	<i>Tythimurium</i>	ST34	+	–	–	–
2019	Crie F165	<i>Tythimurium</i>	ST34	+	–	–	–
2019	Crie F167	<i>Tythimurium</i>	ST34	+	–	–	–
2019	Crie F168	<i>Tythimurium</i>	ST34	+	–	–	–
2019	Crie F170	<i>Enteritidis</i>	ST11	–	+	–	–
2019	Crie F171	<i>Enteritidis</i>	ST11	–	+	–	–
2019	Crie F353	<i>Tythimurium</i>	ST34	+	–	–	–
2018	Crie F46	<i>Tythimurium</i>	ST9644	+	–	–	–
2018	Crie F299	<i>Enteritidis</i>	ST11	–	+	–	–
2018	Crie F36	<i>Tythimurium</i>	ST34	+	–	–	–
2018	Crie F37	<i>Tythimurium</i>	ST34	+	–	–	–
2020	Crie F919	<i>Tythimurium</i>	ST34	+	–	+	–
2020	Crie F920	<i>Tythimurium</i>	ST34	+	–	–	–
2020	Crie F921	<i>Infantis</i>	ST32	–	+	–	–
2021	Crie F1148	<i>Virchow</i>	ST8662	–	+	–	–
2021	Crie F1149	<i>Tythimurium</i>	ST34	+	–	–	–
2021	Crie F1150	<i>Tythimurium</i>	ST34	+	–	–	–
2021	Crie F1151	<i>Tythimurium</i>	ST34	+	–	–	+
2021	Crie F1153	<i>Tythimurium</i>	ST34	+	–	–	–
2021	Crie F1154	<i>Tythimurium</i>	ST34	+	–	–	–
2021	Crie F1155	<i>Tythimurium</i>	ST34	+	–	–	–
2021	Crie F1156	<i>Tythimurium</i>	ST34	+	–	–	–
2021	Crie F1157	<i>Tythimurium</i>	ST34	+	–	–	–
2021	Crie F1159	<i>Tythimurium</i>	ST34	+	–	–	–

Table 6. Genotypic profile of *S. enterica* resistance to co-trimoxazole

Year	Isolate	Serotype	ST	Resistance genes						
				<i>sul3</i>	<i>sul2</i>	<i>sul1</i>	<i>dfrA12</i>	<i>dfrA8</i>	<i>dfrA14</i>	<i>dfrA1</i>
2018	Crie F21	<i>Enteritidis</i>	ST11	+	-	-	-	-	-	-
2018	Crie F28	<i>Typhimurium</i>	ST34	-	+	-	-	-	-	-
2018	Crie F34	<i>Mendoza</i>	ST490	-	-	+	+	-	-	-
2018	Crie F50	<i>Typhimurium</i>	ST34	-	+	-	-	-	-	-
2018	Crie F40	<i>Typhimurium</i>	ST34	-	+	-	-	-	-	-
2018	Crie F46	<i>Typhimurium</i>	ST9644	-	+	-	-	-	-	-
2018	Crie F36	<i>Typhimurium</i>	ST34	-	+	-	-	-	-	-
2018	Crie F37	<i>Typhimurium</i>	ST34	-	+	-	-	-	-	-
2018	Crie F303	<i>Enteritidis</i>	ST11	+	-	-	-	+	-	-
2019	Crie F146	<i>Enteritidis</i>	ST11	+	-	-	-	-	-	-
2019	Crie F296	<i>Typhimurium</i>	ST19	+	-	-	-	-	-	-
2019	Crie F147	<i>Infantis</i>	ST32	-	-	+	-	-	-	-
2019	Crie F149	<i>Typhimurium</i>	ST34	-	+	-	-	-	-	-
2019	Crie F158	<i>Brandenburg</i>	ST9644	-	+	-	-	-	-	-
2019	Crie F298	<i>Mendoza</i>	ST490	-	-	+	+	-	-	-
2019	Crie F164	<i>Typhimurium</i>	ST34	-	+	-	-	-	-	-
2019	Crie F165	<i>Typhimurium</i>	ST34	-	+	-	-	-	-	-
2019	Crie F166	<i>Enteritidis</i>	ST11	-	-	-	-	+	-	-
2019	Crie F167	<i>Typhimurium</i>	ST34	-	+	-	-	-	-	-
2019	Crie F168	<i>Typhimurium</i>	ST34	-	+	-	-	-	-	-
2019	Crie F353	<i>Typhimurium</i>	ST34	-	+	-	-	-	-	-
2020	Crie F919	<i>Typhimurium</i>	ST34	-	+	-	+	-	-	-
2020	Crie F920	<i>Typhimurium</i>	ST34	-	+	-	-	-	+	-
2020	Crie F921	<i>Infantis</i>	ST32	-	-	+	-	-	+	-
2021	Crie F1148	<i>Virchow</i>	8662	-	-	+	-	-	-	+
2021	Crie F1149	<i>Typhimurium</i>	ST34	-	+	-	-	-	-	-
2021	Crie F1150	<i>Typhimurium</i>	ST34	-	+	-	-	-	-	-
2021	Crie F1151	<i>Typhimurium</i>	ST34	-	-	+	-	-	-	+
2021	Crie F1153	<i>Typhimurium</i>	ST34	-	+	-	-	-	-	-
2021	Crie F1154	<i>Typhimurium</i>	ST34	-	+	-	-	-	-	-
2021	Crie F1155	<i>Typhimurium</i>	ST34	-	+	-	-	-	-	-
2021	Crie F1156	<i>Typhimurium</i>	ST34	-	+	-	-	-	-	-
2021	Crie F1157	<i>Typhimurium</i>	ST34	-	+	-	-	-	-	-
2021	Crie F1159	<i>Typhimurium</i>	ST34	-	+	-	-	-	-	-

blaTEM-1B, *aac(6')-Ib-cr*, *catA2*, *qnrB4*, *sull*, *dfrA1* and *tetB*, *tetD*, respectively. The genotypic resistance profile of *S. typhimurium* Crie F1151 culture also included determinants responsible for resistance to *ereA* macrolides. This *Salmonella* isolate was the only one that had the *mcr-9* determinant, despite the phenotypic susceptibility to colistin, as well as the *aac(6')-Ib-cr* de-

terminant responsible for concurrent resistance to fluoroquinolones and aminoglycosides.

Discussion

Salmonellosis is a frequent gastrointestinal infection in humans and a major cause of foodborne disease outbreaks worldwide. In 2019, 87,923 confirmed cases

of salmonellosis were reported in the European Union (EU); 57,702 cases were reported in 2020, being the lowest number reported since 2007 due to the exit of the United Kingdom from EU and the COVID-19 pandemic [9].

We studied *Salmonella enterica* cultures isolated from different food products in Belarus in 2018–2021 for the further assessment of their susceptibility to antibiotics. Our findings showed that pork and poultry products, including processed products, were the most frequent sources of *Salmonella*. Speaking about poultry products, we should note that the prevalence of resistant *Salmonella* increased significantly during the period of studies — from 19.8% in 2018 to 65.1% in 2021. The prevalence of *Salmonella* primarily in pork, chicken and turkey products was comparable with the rates reported by the United States, Egypt and Columbia [12–14]. Throughout the period of studies, the prevailing serotypes were *Enteritidis* (50.8%) and *Typhimurium* (9.0%). The dominance of these serotypes in meat products was also reported by researchers from India and Saudi Arabia, where serotypes *Enteritidis* and *Typhimurium* accounted for more than 95% of isolates [3, 11]. According to the European Union One Health Zoonoses Report (2020), serotype *Enteritidis* also dominated in the European Region [15].

The analysis of phenotypic resistance of cultures isolated in Belarus revealed high susceptibility to antibiotics of the fluoroquinolone group, ranging from 88.4% to 100%. During the monitoring period, the increase in resistant cultures reached 11.6%. In the United States, during 2018–2021, the Centers for Disease Control and Prevention² reported an 8.5% increase in *Salmonella* resistance to ciprofloxacin. High activity of fluoroquinolones was also found for *Salmonella* isolated from pork in Thailand: 76% of the studied cultures were susceptible. *S. enteritidis*, the most common type of *Salmonella* in humans, demonstrated the tendency to increased resistance to antibiotics of the fluoroquinolone group. According to the data from the European Centre for Disease Prevention and Control, in animals the resistance of *S. enteritidis* to these antibiotics ranged from moderate to high [16].

The phenotypic resistance of *Salmonella* isolated in Belarus to third-generation cephalosporins was not high, reaching 16.3%. During 2018–2021, the percentage of cultures resistant third-generation cephalosporins increased 5.6 times: from 2.9% in 2019 to 16.3% in 2021. According to the data from the Centers for Disease Control and Prevention, in the United States³ the percentage of cultures resistant to cephalosporins in the specified period was not large: 2.3% in 2018, 1.7% in 2019 and it remained stable at the level of 2% in 2020

and 2021. The report published by the European Centre for Disease Prevention and Control and the European Food Safety Authority states that in 2019, the percentage of cefotaxime-resistant and ceftazidime-resistant cultures in the European Region remained at low levels — 1.8% and 1.2%, respectively [17].

The increasing prevalence of MDR *Salmonella* poses a significant threat to public health, as it leads to longer hospital stays, longer duration of disease and higher fatality rates compared to susceptible *Salmonella* isolates [17, 18]. In 2021, in its report, the European Centre for Disease Prevention and Control pointed out that the percentage of MDR *S. enterica* isolates from pork and its products increased dramatically to 56.5% [17]. The World Health Organization estimates that of the 100,000 cases of salmonellosis each year, a large number are caused by MDR *S. enterica* [19], with the majority acquired through the consumption of contaminated food of animal origin, particularly beef, pork, and poultry products [20, 21]. Among the studied *Salmonella* isolates from Belarus, 19% of isolates demonstrated the MDR profile with resistance to 3 and more classes of antimicrobial agents, thus showing the consistency with studies by Egyptian researchers [22]. In 2008–2017, in the United States, resistance to 3 and more agents was detected in 28.0% of the bacteria isolated from poultry products [23]. Chinese researchers found that MDR was demonstrated by 95.33% of *Salmonella* isolated from pork [24]; Thai researchers also reported multidrug resistance of 23.2% of *Salmonella* isolated from duck meat [25].

The in silico multilocus sequence typing analysis of MDR *Salmonella* isolated in Belarus identified 5 sequence types of *S. enterica*, which were associated with multidrug resistance of *Salmonella* cultures. The dominant sequence types were represented by ST11 of serovar *Enteritidis* ($47.0 \pm 0.57\%$), ST34 ($33.3 \pm 0.51\%$) and ST19 ($4.5 \pm 0.10\%$) of serovar *Typhimurium*. These sequence types were also common in China and Iraq, where ST19 prevailed among serovar *Typhimurium* *Salmonella* [26–28]. In the European Region, ST11 was a prevailing sequence type of serovar *Enteritidis*, while in Russia, serotype *Infantis* ST32 was dominant [29].

The genotypic studies of cultures isolated in Belarus identified 5 genes responsible for resistance to beta-lactam antibiotics: *blaTEM-1B*, *blaTEM-1C*, *blaDHA-1*, *blaSHV-12*, as well as cephalosporinase *blaCMY-2* genes. The annual increase in the percentage of phenotypically resistant cultures is most likely associated with the activation of resistance genes encoding ESBLs, as the studies showed that 56.5% of all the tested MDR isolates produced ESBLs. The *blaSHV* gene was identified mainly in representatives of the family *Enterobacteriaceae*, which were isolated from different ecosystems: humans, animals, and environment [30, 31]. Likely originated from a chromosomal penicillinase of *Klebsiella pneumoniae*, *SHV* beta-lactamases

² NARMS Now: Human Data.

URL: <https://wwwn.cdc.gov/narmsnow/>

³ Ibid.

currently encompass a large number of allelic variants including ESBLs, non-ESBLs and several non-classified variants; therefore, their significance was emphasized in our studies [32].

The phenotypic characteristics of most MDR cultures ($n = 59$; 85.5%) correlated with the molecular mechanism of resistance and resulted from the spectrum of enzyme activity of beta-lactamases. The obtained data demonstrating the complete correlation between the phenotypic and genotypic characteristics of cultures from Belarus regarding their resistance to third-generation cephalosporins confirmed the diagnostic significance of such indicator substances as ceftazidime, ceftriaxone, cefoperazone and cefotaxime. During their three-year monitoring of *Salmonella* isolated from different categories of food products, the European laboratories also proved the diagnostic value of ceftriaxone, ceftazidime and cefotaxime substances for detection of cephalosporinases [9]. A sharp increase in the percentage of cultures phenotypically resistant to tetracycline — from 3.9% to 23.3%, along with a high percentage of cultures (52.2%) containing resistance determinants, can be indicative of excessive use of tetracycline antibiotics in agriculture, resulting in accumulation and transfer of antibiotic-resistance genes among pathogenic bacteria. The presence of antibiotic-resistance determinants in susceptible cultures as well as the presence of *ereA* and *mcr-9* genes in *S. typhimurium* Crie F-1151 can serve as proof of *Salmonella*'s ability to act as a vector for transfer of antibiotic-resistance genes to other microorganisms. According to the published data, *mcr-9* determinants, together with *mcr-1* determinants, are considered the most common in the world [33]. Based on the data from the National Database of Antibiotic Resistant Organisms, the United States takes the lead by the number of *mcr-9*-positive isolates. In Europe, Russia and China, *mcr-9* and *mcr-1* determinants prevail [33].

The findings are certainly alarming, as all the studied bacterial isolates were received from sam-

ples of food products intended for human consumption. Although the risk of foodborne diseases can be reduced by heat treatment of food products, antibiotic-resistance genes may persist and, when entering the host, can be transferred to intestinal microbiocenosis, passing the resistance to other microorganisms [34]. Thus, our findings fall in line with the latest recommendations of the European Food Safety Authority that emphasized the significance of studying phenotypic and genotypic characteristics of foodborne bacterial isolates for monitoring and surveillance of antibiotic resistance, especially, for implementing the One Health approach that recognizes that the health of people is closely connected with the health of animals and the environment.

Conclusion

The irrational use of antibiotics in human and veterinary medicine has greatly contributed to the emergence and spread of resistant isolates of non-typhoid *Salmonella*.

The findings of our studies regarding the slowly growing phenotypic resistance to first-line antibiotics (cephalosporins and fluoroquinolones) and the presence of plasmid-mediated resistance determinants imply the possibility of a seriously limited choice of effective antimicrobial agents in future. Therefore, monitoring of antimicrobial resistance phenotypes and genotypes as well as transmission routes of *Salmonella enterica* cultures through the food chain is critically important.

The existing large diversity of resistance determinants and high phenotypic susceptibility of isolates lead to assumption that sources of bacterial isolates could be affected by antibiotics and/or could acquire resistance determinants from other microorganisms.

The conducted studies demonstrate the need for the further monitoring of prevalence of antibiotic resistant bacteria of food origin in Belarus, especially in the context of the One Health approach.

REFERENCES

1. Pavlova A.S., Bocharova Yu.A., Kuleshov K.V., et al. Molecular determinants of antibiotic resistance in *Salmonella enterica* antibiotic resistance. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2021;98(6):721–30. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-140>. EDN: <https://elibrary.ru/zqrygu>
2. Reshetneva I.T., Per'yanova O.V., Dmitrieva G.M., Ostapova T.S. Antibiotic resistance of *Salmonella* spp. isolated in the territory of the Krasnoyarsk region. *Hygiene and Sanitation*. 2015;94(2):35–8. EDN: <https://elibrary.ru/tphjlx>
3. Al-Ansari M.M., Aljubali M.M., Somily A.M., et al. Isolation and molecular characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovars. *J. Infect. Public Health*. 2021;14(12):1767–76. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.011>
4. Pokhilenko V.D., Baranov A.M., Detushev K.V. Methods of long-term storage of collection cultures of microorganisms and development trends. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Povolzhskiy region. Meditsinskii nauki*. 2009;(4):99–121. EDN: <https://elibrary.ru/lakpfx>
5. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol*. 2012;19(5):455–77. DOI: <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
6. Shelentov A., Mikhaylova Y., Yanushevich Y., et al. Molecular typing, characterization of antimicrobial resistance, virulence profiling and analysis of whole-genome sequence of clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Antibiotics (Basel)*. 2020;9(5):261. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050261>
7. Zankari E., Hasman H., Cosentino S., et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother*. 2012;67(11):2640–4. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dks261>
8. Yakovlev V.P. Antimicrobial preparations of fluoroquinolones group. *Consilium Medicum*. 2006;8(1):35–41. EDN: <https://elibrary.ru/rglboxl>
9. Gambino D., Gargano V., Butera G., et al. Food is reservoir of MDR *Salmonella*: prevalence of ESBLs profiles and resistance genes in strains isolated from food. *Microorganisms*. 2022;10(4):780. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040780>
10. Ngoi S.T., Teh C.S., Chai L.C., Thong K.L. Overview of molecular typing tools for the characterization of *Salmonella enterica* in Malaysia. *Biomed. Environ. Sci*. 2015;28(10):751–64. DOI: <https://doi.org/10.3967/bes2015.105>
11. Kumar Y., Singh V., Kumar G., et al. Serovar diversity of *Salmonella* among poultry. *Indian J. Med. Res*. 2019;150(1):92–5. DOI: https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1798_17
12. Mamber S.W., Mohr T., Barlow K., et al. Occurrence of *Salmonella* in ready-to-eat meat and poultry product samples from U.S. Department of Agriculture-Regulated Producing Establishments. II. *Salmonella* in ready-to-eat pork barbecue products, from 2005 to 2012. *J. Food Prot*. 2018;81(10):1737–42. DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-026>
13. Rodríguez R., Fandiño C., Donado P., et al. Characterization of *Salmonella* from commercial egg-laying hen farms in a central region of Colombia. *Avian Dis*. 2015;59(1):57–63. DOI: <https://doi.org/10.1637/10873-052714-reg>
14. Elkenany R., Elsayed M.M., Zakaria A.I., et al. Antimicrobial resistance profiles and virulence genotyping of *Salmonella enterica* serovars recovered from broiler chickens and chicken carcasses in Egypt. *BMC Vet. Res*. 2019;15(1):124. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1867-z>
15. European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA J*. 2021;19(12):e06971. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6971>
16. European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2019-2020. *EFSA J*. 2022;20(3):e07209. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7209>
17. European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019. *EFSA J*. 2021;19(4):e06490. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6490>
18. Proietti P.C., Stefanetti V., Musa L., et al. Genetic profiles and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella infantis* strains isolated in Italy in the food chain of broiler meat production. *Antibiotics (Basel)*. 2020;9(11):814. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110814>
19. WHO. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. Geneva; 2014.
20. Castro-Vargas R.E., Herrera-Sánchez M.P., Rodríguez-Hernández R., Rondón-Barragán I.S. Antibiotic resistance in *Salmonella* spp. isolated from poultry: a global overview. *Vet. World*. 2020;13(10):2070–84. DOI: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.2070-2084>
21. Campos J., Mourão J., Peixe L., Antunes P. Non-typhoidal *Salmonella* in the pig production chain: a comprehensive analysis of its impact on human health. *Pathogens*. 2019;8(1):19. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens8010019>
22. Lamas A., Fernandez-No I.C., Miranda J.M., et al. Prevalence, molecular characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* serovars isolated from northwestern Spanish broiler flocks (2011–2015). *Poult. Sci*. 2016;95(9):2097–105. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps/pew150>
23. Yin X., M'ikanatha N.M., Nyirabahizi E., et al. Antimicrobial resistance in non-Typhoidal *Salmonella* from retail poultry meat by antibiotic usage-related production claims – United States, 2008–2017. *Int. J. Food Microbiol*. 2021;342:109044. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109044>
24. Xu Z., Chen X., Tan W., et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* in fattening pigs in Hubei Province, China. *Microb. Drug Resist*. 2021;27(11):1594–602. DOI: <https://doi.org/10.1089/mdr.2020.0585>
25. Sinwat N., Witoonsatian K., Chumsing S., et al. Antimicrobial resistance phenotypes and genotypes of *Salmonella* spp. isolated from commercial duck meat production in Thailand and their minimal inhibitory concentration of disinfectants. *Microb. Drug Resist*. 2021;27(12):1733–41. DOI: <https://doi.org/10.1089/mdr.2020.0230>
26. Yang J., Zhang Z., Zhou X., et al. Prevalence and characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* isolates from retail foods in Shanghai, China. *Foodborne Pathog. Dis*. 2020;17(1):35–43. DOI: <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2671>
27. Zhao X., Hu M., Zhang Q., et al. Characterization of integrons and antimicrobial resistance in *Salmonella* from broilers in Shandong, China. *Poult. Sci*. 2020;99(12):7046–54. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.09.071>
28. Harb A., Habib I., Mezal E.H., et al. Occurrence, antimicrobial resistance and whole-genome sequencing analysis of *Salmonella* isolates from chicken carcasses imported into Iraq from four different countries. *Int. J. Food Microbiol*. 2018;284:84–90. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.007>
29. Egorova A., Mikhaylova Y., Saenko S., et al. Comparative whole-genome analysis of Russian foodborne multidrug-resistant *Salmonella infantis* isolates. *Microorganisms*. 2021;10(1):89. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010089>
30. Alcalá L., Alonso C.A., Simón C., et al. Wild birds, frequent carriers of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Esche-*

- richia coli* of CTX-M and SHV-12 types. *Microb. Ecol.* 2016; 72(4):861–9. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0718-0>
31. Liakopoulos A., Mevius D., Ceccarelli D. A review of SHV extended-spectrum β -lactamases: neglected yet ubiquitous. *Front. Microbiol.* 2016;7:1374. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01374>
 32. Bush K. Past and present perspectives on β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2018;62(10):e01076–18. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.01076-18>
 33. Ling Z., Yin W., Shen Z., et al. Epidemiology of mobile colistin resistance genes MCR-1 to MCR-9. *J. Antimicrob. Chemother.* 2020;75(11):3087–95. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa205>
 34. Groussin M., Poyet M., Sistiaga A., et al. Elevated rates of horizontal gene transfer in the industrialized human microbiome. *Cell.* 2021;184(8):2053–67.e18. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.052>

Information about the authors

Nina G. Kulikova[✉] — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of human clinical microbiology and microbial ecology, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, kulikova_ng@cmd.su, <https://orcid.org/0000-0002-1716-6969>

Alexey V. Chernyshkov — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of human clinical microbiology and microbial ecology, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7049-4195>

Yuliya V. Mikhaylova — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory for molecular mechanisms of antibiotic resistance, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5646-538X>

Alexander L. Zenkovich — deputy chief physician of the laboratory case, Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Minsk, Belarus

Daria A. Dovnar — doctor, Microbiological reference laboratory, Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Minsk, Belarus

Aia M. Mareiko — doctor, Microbiological reference laboratory, Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Minsk, Belarus

Lyutsiya A. Bityumina — bacteriologist, Laboratory of human clinical microbiology and microbial ecology, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5378-0827>

Andrey A. Shelenkov — Cand. Sci. (Appl. Math.), senior researcher, Laboratory of molecular mechanisms of antibiotic resistance, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7409-077X>

Anna E. Egorova — researcher, Laboratory of molecular mechanisms of antibiotic resistance, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0486-1353>

Stepan S. Saenko — junior researcher, Laboratory of molecular mechanisms of antibiotic resistance, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4925-1308>

Igor N. Manzeniuk — Cand. Sci. (Med.), assistant director for research, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1146-1430>

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

The article was submitted 01.11.2022;
accepted for publication 14.01.2023;
published 28.04.2023

Информация об авторах

Куликова Нина Георгиевна[✉] — к.б.н., с.н.с. направления клинической микробиологии лаб. клинической микробиологии и микробной экологии человека ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, kulikova_ng@cmd.su, <https://orcid.org/0000-0002-1716-6969>

Чернышков Алексей Валерьевич — к.м.н., с.н.с. направления клинической микробиологии лаб. клинической микробиологии и микробной экологии человека ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7049-4195>

Михайлова Юлия Владимировна — к.б.н., зав. лаб. молекулярных механизмов антибиотикорезистентности ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5646-538X>

Зенькович Александр Леонидович — зам. главного врача по лабораторному делу Республиканского центра гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, Минск, Беларусь

Довнар Дарья Александровна — врач-бактериолог микробиологической референс-лаборатории Республиканского центра гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, Минск, Беларусь

Марейко Алла Михайловна — врач-бактериолог микробиологической референс-лаборатории Республиканского центра гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, Минск, Беларусь

Битюмина Люция Айткалиевна — врач-бактериолог направления клинической микробиологии лаб. клинической микробиологии и микробной экологии человека ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5378-0827>

Шеленков Андрей Александрович — к.ф.м.н., с.н.с. лаб. молекулярных механизмов антибиотикорезистентности ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7409-077X>

Егорова Анна Евгеньевна — н.с. лаб. молекулярных механизмов антибиотикорезистентности ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0486-1353>

Саенко Степан Сергеевич — м.н.с. лаб. молекулярных механизмов антибиотикорезистентности ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4925-1308>

Манзенюк Игорь Николаевич — к.м.н., помощник директора по научной работе ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1146-1430>

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

Статья поступила в редакцию 01.11.2022;
принята к публикации 14.01.2023;
опубликована 28.04.2023

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-329>

The structure of ESKAPE pathogens isolated from patients of the neonatal intensive care unit at the National Hospital of Pediatrics in Hanoi, the Socialist Republic of Vietnam

Tatiana F. Stepanova¹, Lyubov V. Kataeva^{1✉}, Olga V. Posoyuznykh¹, Alexander G. Bogun², Angelina A. Kislichkina², Tran Thi Nhai³

¹Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russia;

²State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia;

³Joint Russian-Vietnamese Tropical Research and Technology Center (Tropical Center), Hanoi, Vietnam

Abstract

Introduction. The incidence of healthcare-associated infections is a major public health problem worldwide, affecting all countries regardless of their economic status. The main agents of these infections are pathogens belonging to the ESKAPE group.

The **aim** of the study was to explore the structure, molecular and antigenic characteristics of the ESKAPE pathogens isolated from oral and anal mucosa of patients of the neonatal intensive care unit (NICU), and to assess their etiological significance in occurrence of healthcare-associated infections.

Materials and methods. Samples from a total of 49 children were tested, including 40 newborns – patients of NICU at the National Hospital of Pediatrics in Hanoi. Collection and processing of biomaterial (oropharyngeal swabs, rectal swabs) and isolation of bacterial cultures were performed using conventional bacteriological methods. Mass spectrometry was used for identification of isolates. *Klebsiella pneumoniae* strains were analyzed using the whole-genome sequencing method.

Results. The group of gram-positive ESKAPE pathogens identified in oral mucosa was represented by isolates *Enterococcus faecium* and *Staphylococcus aureus*. The isolates of the family *Enterobacteriaceae* included *K. pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*; the group of nonfermenting gram-negative bacteria was represented by *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*. The structure of ESKAPE pathogens persistent in anal mucosa was characterized by dominance of *Enterococcus* spp., *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* bacteria. The whole-genome sequencing of *K. pneumoniae* isolates revealed 7 clusters and 8 sequence types. ST14 and ST1741 prevailed, accounting for 25%, respectively, of the total number of the studied strains. The molecular serotyping showed that by the O antigen, strains belonged mainly to serotypes O1v1, O1/ O2v2, O5; by the presence of the capsular antigen — to serotypes KL2, KL104, KL60.

Conclusion. The analysis of the structure of the ESKAPE pathogens isolated from the oral and anal mucosa of patients of NICU at the National Hospital of Pediatrics in Hanoi identified etiological significant agents of bacterial infections: *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*. The molecular and genetic analysis of *K. pneumoniae* strains co-circulating in mucous membranes of several patients of the unit revealed their homology, thus confirming healthcare-associated contamination of children with nosocomial strains.

Keywords: ESKAPE pathogens, newborns, oral and anal mucosa, *Klebsiella pneumoniae*, sequence types, molecular serotyping

Ethics approval. The study was performed with the voluntary informed consent of the legal representatives of underage patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Tyumen Region Infection Pathology Research Institute (protocol No. 1, June 1, 2022).

Funding source. The study was supported by budget financing within the framework of research work No. AAA-A-20-1200109990062-4.

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

For citation: Stepanova T.F., Kataeva L.V., Posoyuznykh O.V., Bogun A.G., Kislichkina A.A., Tran Thi Nhai. The structure of ESKAPE pathogens isolated from patients of the neonatal intensive care unit at the National Hospital of Pediatrics in Hanoi, the Socialist Republic of Vietnam. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology* = *Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2023;100(2):168–177. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-329> EDN: <https://www.elibrary.ru/mlnafx>

Структура ESKAPE-патогенов, изолированных от пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии новорождённых Национального госпиталя педиатрии г. Ханой, Социалистическая Республика Вьетнам

Степанова Т.Ф.¹, Катаева Л.В.^{1✉}, Посоюзных О.В.¹, Богун А.Г.²,
Кисличкина А.А.², Tran Thi Nhai³

¹Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, Тюмень, Россия;

²Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, Оболенск, Россия;

³Совместный Российско-Вьетнамский тропический научно-исследовательский и технологический центр (Тропический центр), Ханой, Вьетнам

Аннотация

Введение. Заболеваемость инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи, является одной из глобальных мировых проблем на современном этапе развития здравоохранения и затрагивает все страны вне зависимости от их экономического статуса. Основными возбудителями этих инфекций являются патогены группы ESKAPE.

Цель исследования — изучить структуру, молекулярные и антигенные характеристики ESKAPE-патогенов, выделенных со слизистых зева и ануса пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии новорождённых (ОРИТН), для установления их этиологического значения в возникновении инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи.

Материалы и методы. Обследовано 49 детей, в том числе 40 новорождённых, пациентов ОРИТН Национального госпиталя педиатрии г. Ханой. Посев биоматериала (мазки со слизистых зева, ректальные мазки) и выделение бактериальных культур осуществлялись классическим бактериологическим методом. Идентификация изолятов проведена методом масс-спектрометрии. Штаммы *Klebsiella pneumoniae* изучены методом полногеномного секвенирования.

Результаты. Группа грамположительных ESKAPE-патогенов, идентифицированных со слизистой зева, представлена изолятами *Enterococcus faecium* и *Staphylococcus aureus*. Среди изолятов семейства *Enterobacteriaceae* выделены *K. pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*; в группе неферментирующих грамотрицательных бактерий — *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*. Структура ESKAPE-патогенов, персистирующих на слизистой ануса, характеризовалась преобладанием бактерий *Enterococcus* spp., *E. coli*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*. Результаты полногеномного секвенирования изолятов *K. pneumoniae* выявили 7 кластеров и 8 сиквентипов. Преимущественно определены ST14 и ST1741 — по 25% соответственно от количества исследованных штаммов. Молекулярное серотипирование установило, что по O-антигену штаммы отнесены в основном к серотипам O1v1, O1/O2v2, O5; по наличию капсульного антигена — к серотипам KL2, KL104, KL60.

Заключение. Исследование структуры ESKAPE-патогенов, изолированных со слизистых зева и ануса пациентов ОРИТН Национального госпиталя педиатрии г. Ханой, выявили этиологически значимых возбудителей бактериальных инфекций: *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*. Проведение молекулярно-генетических исследований штаммов *K. pneumoniae*, циркулирующих одновременно на слизистых нескольких пациентов отделения, позволило установить их гомологию, что указывает на контаминацию детей госпитальными штаммами при оказании медицинской помощи.

Ключевые слова: ESKAPE-патогены, новорождённые, слизистые зева и ануса, *Klebsiella pneumoniae*, сиквентипы, молекулярное серотипирование

Этическое утверждение. Исследование выполнено при добровольном информированном согласии законных представителей несовершеннолетних пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Тюменского научно-исследовательского института краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора (протокол № 1 от 01.06.2022).

Источник финансирования. Исследование выполнено при поддержке бюджетного финансирования в рамках НИР № АААА-А20-1200109990062-4.

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

Для цитирования: Степанова Т.Ф., Катаева Л.В., Посоюзных О.В., Богун А.Г., Кисличкина А.А., Tran Thi Nhai Структура ESKAPE-патогенов, изолированных от пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии новорождённых Национального госпиталя педиатрии г. Ханой, Социалистическая Республика Вьетнам. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(2):168–177. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-329> EDN: <https://www.elibrary.ru/mlnofx>

Introduction

Neonatal bacterial infections are associated with multiple risk factors. The diversity of clinical forms of childhood infections is explained, first of all, by immaturity of natural barrier defenses, especially, when antimicrobial therapy is involved [1]. The level of infectious morbidity is determined mainly by the frequency of damage to the skin, eyes, navel and gastrointestinal tract. Therefore, monitoring of circulating ESKAPE pathogens is of critical importance at maternity care centers, as the risk of bacterial diseases is increased due to the physiological status of newborns [2, 3].

Widespread occurrence of healthcare-associated infections (HAIs) in any healthcare facility, most particularly, in maternity and pediatric hospitals causes significant damage to the health of newborns and general population, economy and demographic situation in various countries [4, 5]. Frequently, the numbers of cases of neonatal hospital-acquired infections, which are reported in Russian and foreign publications, cannot be compared due to the absence of common approaches to the system of recording and reporting diseases [6, 7].

The spread of multidrug-resistant nosocomial pathogens causing infectious complications in children raises concerns among clinicians worldwide. In recent years, the ESKAPE group has been highlighted among the etiologically significant bacteria, including *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter* spp. The dominant role among these agents of hospital-acquired infections belongs to the pathogens that are characterized by diversity of antimicrobial resistance mechanisms. The World Health Organization included ESKAPE pathogens in the group of microorganisms of the highest priority for development of new antibiotics or new treatment methods [8].

The burden of hospital-acquired infections, especially among children, in low and middle-income countries is unknown, mostly due to a lack of reported data. The European multicenter study of cases with hospital-acquired infections in pediatric hospitals showed that their prevalence ranged from 2.5% in general care units to 23.6% in intensive care units. High rates of these infections were also recorded in neonatal intensive care units, where their prevalence was 3–20 times as high in resource-limited settings compared to high-income countries.

Vietnam is a low-income country with fast growing public and private health sectors. Because of the low levels of the gross national income and nation-

al health expenditure per capita, personal health care expenditures account for around 80%. Antibiotics are widely used by the population and are most commonly purchased in private pharmacies and clinics. The healthcare sector is overloaded with the relatively low number of healthcare personnel per capita (7 doctors per 10,000 population), shortage of inpatient beds and hospital overcrowding reaching 170%. Vietnam has no national system of epidemiological surveillance of HAIs; the data on cases in intensive care units are limited. Considering high infection rates, Vietnam becomes a "hotspot" for the emergence of antimicrobial resistance with the rates among the highest in Asia [9–11].

The earlier performed studies of hospital-acquired infections in intensive care units at 3 Vietnamese pediatric hospitals showed that their prevalence was 33% [9]. *K. pneumoniae* is among the leading bacteria that cause nosocomial infections and can develop antimicrobial resistance [11–13]. The results of molecular and genetic studies of strains of bacteria co-circulating in a particular unit of a specific hospital show their high heterogeneity. Priority attention should be given to measures preventing the emergence of highly virulent and resistant strains and stopping their spread [14].

The study of the diversity of ESKAPE pathogens contaminating newborns, including premature infants receiving treatment in neonatal intensive care units (NICU) is a top-priority task of healthcare organizations both in Russia and other countries; its achievement will help minimize the risks associated with adverse epidemiological situations.

The **aim** of the study was to explore the structure, molecular and antigenic characteristics of ESKAPE pathogens isolated from oral and anal mucous membranes of NICU patients, and to assess their etiological significance in occurrence of HAIs.

The studies were conducted in accordance with R&D of the Tyumen Research Institute for Regional Infectious Diseases Pathology of Rospotrebnadzor in the pursuance of the Action Plan for Provision of Scientific, Methodological, Material and Technical Assistance to the Socialist Republic of Vietnam, addressing the threat of infectious diseases and minimization of risks associated with health-hazardous chemical substances in 2020–2022.¹

Materials and methods

The study included 49 children aged 0–60 days, in-

¹ Executive Order No. 1536-p of the Government of the Russian Federation, 13/7/2019.

cluding 40 newborns (the median was 13 days; Q_1 – Q_3 : 7–23), who received treatment in NICU at the National Hospital of Pediatrics in Hanoi. Biomaterial samples were collected simultaneously from all children, regardless of their age, type of delivery, degree of prematurity, birth weight, type of feeding, length of stay in the unit, antibiotic treatment (the random sampling method). The study was performed with the voluntary informed consent of representatives of the patients. The study protocol was approved by Ethics Committee of the Tyumen Research Institute for Regional Infectious Diseases Pathology of Rospotrebnadzor (minutes No. 1 of 01.06.2022).

The bacteriological study was performed using 98 samples of biomaterial collected from oral and anal mucous membranes of the children; microbial growth was recorded in 96 specimens. A total of 101 isolates were isolated from the oral mucosa of the children, and 137 isolates were isolated from the anal mucosa. The *K. pneumoniae* strains ($n = 20$) isolated from the above loci were studied using whole-genome sequencing.

Microbiological studies were conducted using the conventional bacteriological method. The species identification of bacteria was confirmed by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry using the Maldi BioTyper 3.0 software. The identification level above 2.0 was indicative of a high degree of confidence.

The obtained reads for each strain were assembled into contigs using the Unicycler v.0.4.7 program. Samples with the average genome coverage above 200 indicated that the amount of data was sufficient. The results of whole-genome sequencing were analyzed using the Kraken Metagenomics version 2 software for analysis of metagenomic samples (the classifier of reads — short nucleotide sequences). Phylogenetic studies were performed using the Wombac 2.0 program that made it possible to find core single nucleotide polymorphisms (SNPs) in nucleotide sequences and to perform alignment of these polymorphisms. The Kaptive web-based tool was used for detection of O antigens and capsular antigens of *K. pneumoniae* strains. Sequence types were identified using MLST 2.0² and Lasergene software.

Microsoft Office Excel 2016 spreadsheets were used for collecting, correcting, systematizing of the input information and for visualization of the obtained results. Statistical methods and the SPSS v. 22 software were used for analysis of the received data. Nominal data were described using absolute values and percentages, including 95% confidence intervals (CI) — the Clopper–Pearson method.

Results

The results of the bacteriological studies of the children's oral and anal mucosa show that the ob-

tained isolates are represented by gram-positive and gram-negative bacteria as well as by the minor quantity of fungi of the genus *Candida*. The group of gram-positive bacteria (27.3% [95% CI, 21.7–33.4]) was comprised by bacteria of the genera *Staphylococcus* (*S. aureus* and other species), *Streptococcus* (primarily *S. vestibularis*, *S. salivarius*) and *Enterococcus faecalis*. Gram-negative isolates are represented by *Enterobacteriales* bacteria (41.6% [95% CI, 35.3–48.1]) and nonfermenting gram-negative bacteria (22.7% [95% CI, 17.5–28.5]). Among representatives of *Enterobacteriales*, we identified bacteria of the following genera: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Enterobacter*; the cluster of nonfermenting gram-negative bacteria was comprised by *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas maltophilia* and *Elizabethkingia meningoseptica*. The isolates from the studied loci demonstrated the dominance of *Enterobacteriales* bacteria. Fungi of the genus *Candida* accounted for 8.4% [95% CI, 5.2–12.7].

The analysis of the quantity of the isolates from the specified loci showed insignificant dominance of *Enterobacteriales* bacteria in anal mucosa. In the children's oral mucosa, nonfermenting gram-negative bacteria were detected in 35.6% of cases [95% CI, 26.4–45.8] compared to their detection rate for anal mucosa — 13.1% [95% CI, 8.0–19.9] (**Fig. 1**). Groups of gram-positive bacteria isolated from oral and anal mucosa were detected almost in equal percentages.

Among the total number of identified isolates from the specified loci, 51.7% [95% CI, 45.1–58.2] of strains belonged to the ESKAPE group of pathogens: *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*. The comparative analysis of the structure of ESKAPE bacteria identified from the biomaterial samples collected from oral and anal mucosa of the children is presented in **Fig. 2**.

The analysis of isolates of the ESKAPE group, which were obtained from the oral mucosa, showed that bacteria of the family *Enterobacteriaceae* and nonfermenting gram-negative bacteria prevailed in the above locus. At the same time, *S. viridans* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp., which represent a resident microbiota of the oral cavity, were identified in oral mucous membranes of the examined children.

The bacteriological analysis of the samples of biological materials collected from the patients showed that *K. pneumoniae* bacteria prevailed in microbiota of the oral and rectal mucosa in 51.9% of cases. The results of whole-genome sequencing of *K. pneumoniae* strains isolated from the oral mucosa ($n = 9$) and the rectal mucosa ($n = 11$) show that the selected strains were divided into 7 genetic clusters. Cluster I included *K. pneumoniae* strains 39, 51, 57, 85 (isolated from the oral mucosa) and strains 42, 56, 96 (from the rectal mucosa). The structural analysis of core SNP genomes of *K. pneumoniae* strains within cluster I showed that the

² Multi-Locus Sequence Typing.
URL: <https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST>

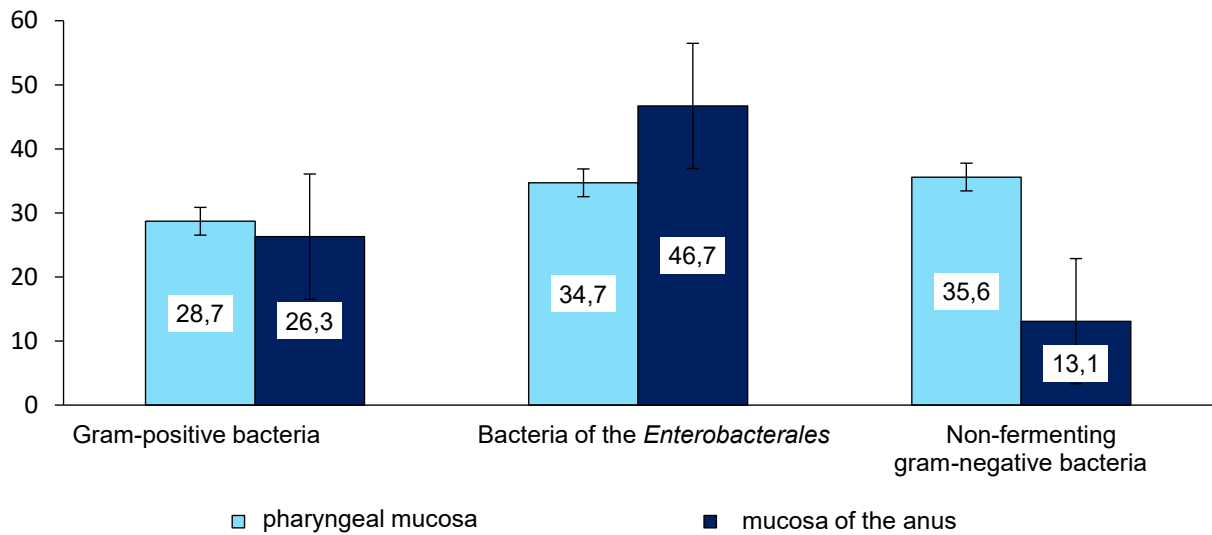


Fig. 1. The detection frequency of isolates of the main bacteria groups in oral and anal mucosa of the children, %.

cluster is divided into two groups with genomes differing from each other by a little over 10,000 SNP. The first group is represented by strains 39, 42, 51, 56, 57; the second group — by strains 85, 96. The results of pairwise comparison of contig assemblies are shown in **Table 1**. The analysis of core SNPs in the first group of strains showed that they differed not more than by 55, thus confirming the high homology of these isolates.

Cluster II was formed by strains 91, 49 (from the oral mucosa) and strains 92, 50, 66 (from the rectal mucosa); cluster III — by strains 53 (from the oral mucosa) and strains 54, 68 (from the rectal mucosa). Clusters IV, V, VI, and VII are represented by strains 74 and 82 — from the rectal mucosa and strains 59, 31 — from the oral mucosa. The molecular serotyping by O and

capsular antigens showed that each cluster of *K. pneumoniae* strains could be assigned to a specific serotype (**Table 2**). By the O antigen, all strains of clusters I and VII are assigned to serotype O1v1. Strains of the second cluster had some differences by the O antigen and were assigned to O1/O2v2 and O1v2, including the strain of cluster V. Clusters III and IV were represented by strains containing the O5 antigen. The strain with the O3b antigen was assigned to cluster VI.

The analysis of the capsular antigen (KL) showed that strains of all clusters were homogenous, except for cluster I, in which 5 *K. pneumoniae* strains belonged to serotype KL2 and 2 strains belonged to KL112.

The multilocus sequence typing revealed that strains of a specific cluster belonged to the same se-

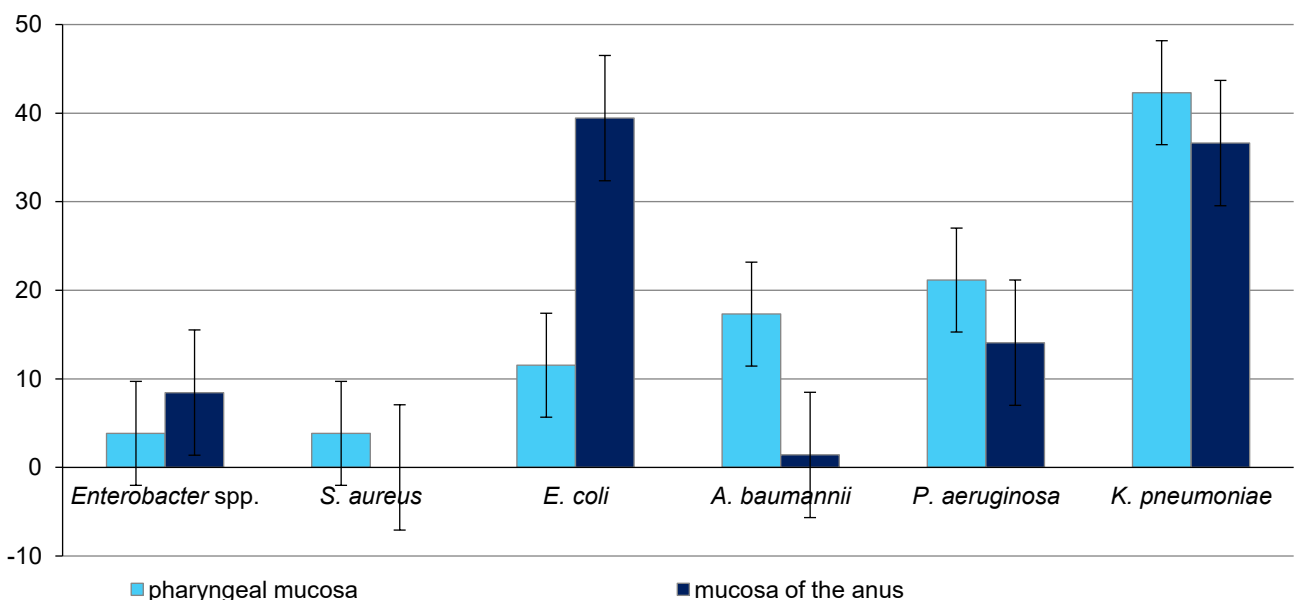


Fig. 2. Comparative analysis of ESKAPE pathogens isolated from oral and anal mucosa of the children, %.

Table 1. Results of comparison of contig assemblies of *K. pneumoniae* strains belonging to cluster I

SNP-dists 0.6.3	Strain 85	Strain 96	Strain 51	Strain 56	Strain 57	Strain 39
<i>K. pneumoniae</i> 96	19					
<i>K. pneumoniae</i> 51	10987	10987				
<i>K. pneumoniae</i> 56	10997	10993	52			
<i>K. pneumoniae</i> 57	10980	10980	17	55		
<i>K. pneumoniae</i> 39	10986	10984	15	55	16	
<i>K. pneumoniae</i> 42	10986	10986	11	51	8	10

quence type (ST), except for cluster I that included ST14 and ST15. Regarding the homology of strains by clusters, it was found that genotypes in all clusters were identical by loci *tonB*, *rpoB*, *phoE*, *pgi*, *mdh*, *gapA*; differences were recorded only in cluster I, locus *infB* (Table 3).

Discussion

The examined children were patients in the intensive care unit of a large specialized pediatric center and most of them were premature infants. The degree of prematurity of newborns depended on perinatal risk factors: type of delivery, gestational age, birth weight, asphyxia, respiratory distress syndrome or congenital abnormalities. Although the above data were not provided for the analysis, they can contribute to predisposition to contamination of children's mucous mem-

branes with ESKAPE pathogens circulating in the unit and to development of bacterial diseases.

The studies of oral and rectal mucous membranes of NICU patients at the National Hospital of Pediatrics in Hanoi demonstrated a great diversity of circulating bacteria belonging to the ESKAPE group and being etiologically significant agents of bacterial infections, including HAIs. Note that *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* isolates from rectal mucosa belong to highly dangerous pathogens and are responsible for most of the hospital-acquired infections in immunocompromised patients [15, 16]. At the same time, *Enterococcus* spp. and *E. coli* bacteria are important components of gut microbiota [13, 17].

Some publications addressing cases of HAIs in intensive care units at Vietnamese pediatric hospitals state that *K. pneumoniae* bacteria are the most frequent

Table 2. Results of molecular serotyping of *K. pneumoniae* strains

Name of the strain	KL-antigen	O-antigen	Cluster
<i>K. pneumoniae</i> 39	KL2	O1M	
<i>K. pneumoniae</i> 42	KL2	O1M	
<i>K. pneumoniae</i> 51	KL2	O1M	
<i>K. pneumoniae</i> 56	KL2	O1M	I
<i>K. pneumoniae</i> 57	KL2	O1M	
<i>K. pneumoniae</i> 85	KL112	O1M	
<i>K. pneumoniae</i> 96	KL112	O1M	
<i>K. pneumoniae</i> 92	KL104	O1/O2v2	
<i>K. pneumoniae</i> 50	KL104	O1/O2v2	
<i>K. pneumoniae</i> 66	KL104	O1v2	II
<i>K. pneumoniae</i> 49	KL104	O1/O2v2	
<i>K. pneumoniae</i> 91	KL104	O1/O2v2	
<i>K. pneumoniae</i> 68	KL60	O5	
<i>K. pneumoniae</i> 54	KL60	O5	III
<i>K. pneumoniae</i> 53	KL60	O5	
<i>K. pneumoniae</i> 74	KL114	O5	IV
<i>K. pneumoniae</i> 59	KL62	O1v2	V
<i>K. pneumoniae</i> 82	KL128	O3b	VI
<i>K. pneumoniae</i> 31	KL62	O1M	VII
<i>K. pneumoniae</i> 95	–	–	–

Note. Strain 95 — non-serotyped by the O antigen and KL antigen.

lation of pathogens belonging to the ESKAPE group is required not only when the occurrence of bacterial infection has been reported, but also routinely [26]. The microbiological monitoring of ESKAPE patho-

gens, which is based on molecular and genetic studies, will be instrumental in detection of HAI pathogens and forecasting of epidemiological situations when providing care to newborns.

REFERENCES

- Mukhamedova Sh.T., Shamsutdinov A.S., Khamraeva D.R., Karomatova F.A. Nosocomial infections in newborns. *Biologiya i integrativnaya meditsina*. 2021;(3):75–86. EDN: <https://www.elibrary.ru/eosqum>
- Nikitina I.V., Gerasimova A.V., Ivanova L.A., et al. Health care-associated infections in critically ill premature newborns: epidemiology, clinical features and diagnostics in modern conditions. *Neonatology: News, Opinions, Training*. 2020;8(3):7–17. DOI: <https://doi.org/10.33029/2308-2402-2020-8-3-7-17> EDN: <https://www.elibrary.ru/ikcmfj>
- Martin R.M., Bachman M.A. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2018;8:4. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00004>
- Bogdanova N.M. Prevention of intrabreast infection in general supporting institutions at the organization of breastfeeding. *Medicine: Theory and Practice*. 2019;4(1):132–7. EDN: <https://www.elibrary.ru/klykty>
- Ivanova M.V., Mindlina A.Ya., Polibin R.V., Ushanova A.V. Russia-wide epidemiological survey of congenital and nosocomial infections in newborns. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2019;9(1):193–202. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2019-1-193-202> EDN: <https://www.elibrary.ru/zgxqvf>
- Naigovzina N.B., Popova A.Yu., Biryukova E.E., et al. Optimization of the system of measures to control and prevent infections associated with the provision of medical care in the Russian Federation. *Healthcare Management: News, Views, Education. Bulletin of VSHOUZ*. 2018;(1):17–26. EDN: <https://www.elibrary.ru/yusipb>
- Naumkina E.V., Pakhalkova E.V., Pyadochkina T.V., Abrosimova O.A. Microbiological monitoring in the departments of the perinatal center. *Mother and Baby in Kuzbass*. 2018;(1):23–7. EDN: <https://www.elibrary.ru/yopggq>
- Yarets Yu.I. Pathogenic potential of ESKAPE group bacteria isolated from wounds: characterization of phenotypic and genotypic markers and possibility of their practical application. *Journal of the Grodno State Medical University*. 2022;20(4):400–13. DOI: <https://doi.org/10.25298/2221-8785-2022-20-4-400-413> EDN: <https://www.elibrary.ru/vtsale>
- Le N.K., Hf W., Vu P.D., et al. High prevalence of hospital-acquired infections caused by gram-negative carbapenem resistant strains in Vietnamese pediatric ICUs: A multi-centre point prevalence survey. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(27):e4099. DOI: <https://doi.org/10.1097/md.0000000000004099>
- Berglund B., Hoang N.T.B., Lundberg L., et al. Clonal spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* among patients at admission and discharge at a Vietnamese neonatal intensive care unit. *Antimicrob. Resist. Infect. Control*. 2021;10(1):162. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13756-021-01033-3>
- Berglund B., Hoang N.T.B., Tärnberg M., et al. Colistin- and carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying mcr-1 and blaOXA-48 isolated at a paediatric hospital in Vietnam. *J. Antimicrob. Chemother.* 2018;73(4):1100–2. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkx491>
- Piperaki E.T., Syrogiannopoulos G.A., Tzouveleki L.S., Dzikos G.L. *Klebsiella pneumoniae*: virulence, biofilm and antimicrobial resistance. *Pediatr. Infect. Disease*. 2017;36(10):1002–5. DOI: <https://doi.org/10.1097/inf.0000000000001675>
- Bondarenko A.P., Trotsenko O.E., Zaitseva T.A., et al. Microbiological and molecular-biological methods in epidemiological evaluation of healthcare associated infections caused by *Klebsiella pneumoniae*. *The Far Eastern Journal of Infectious Pathology*. 2021;(41):68–75. EDN: <https://www.elibrary.ru/ypthje>
- Skachkova T.S., Shipulina O.Yu., Shipulin G.A., et al. Characterization of genetic diversity of the *Klebsiella pneumoniae* strains in a Moscow tertiary care center using next-generation sequencing. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2019;21(1):69–74. EDN: <https://www.elibrary.ru/wuxmap>
- Zheng X., Wang J.F., Xu W.L., et al. Clinical and molecular characteristics, risk factors and outcomes of Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections in the intensive care unit. *Antimicrob. Resist. Infect. Control*. 2017;6:102. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13756-017-0256-2>
- Belova I.V., Tochilina A.G., Solov'eva I.V., et al. Characteristic of hospital *Klebsiella pneumoniae* strains circulating in the pediatric hospital. *Public Health and Life Environment – PH&LE*. 2019;(8):25–9. DOI: <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2019-317-8-25-29> EDN: <https://www.elibrary.ru/bbavei>
- Peters L., Olson L., Khu D.T.K., et al. Multiple antibiotic resistance as a risk factor for mortality and prolonged hospital stay: A cohort study among neonatal intensive care patients with hospital-acquired infections caused by gram-negative bacteria in Vietnam. *PLoS One*. 2019;14(5):e0215666. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215666>
- Berglund B., Hoang N.T.B., Tärnberg M., et al. Molecular and phenotypic characterization of clinical isolates belonging to a KPC-2-producing strain of ST15 *Klebsiella pneumoniae* from a Vietnamese pediatric hospital. *Antimicrob. Resist. Infect. Control*. 2019;16(8):156. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0613-4>
- Fursova N.K., Astashkin E.I., Lev A.I., et al. Phenotypes and genotypes of classical and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clinical strains isolated in Moscow in 2013–2018. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2018;8(4):747. EDN: <https://www.elibrary.ru/pohodv>
- Chebota' I.V., Bocharova Yu.A., Podoprigo I.V., Shagin D.A. The reasons why *Klebsiella pneumoniae* becomes a leading opportunistic pathogen. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2020;22(1):4–19. DOI: <https://doi.org/10.36488/cmacc.2020.1.4-19> EDN: <https://www.elibrary.ru/ockpac>
- Yu V.L., Hansen D.S., Ko W.C., et al. Virulence characteristics of *Klebsiella* and clinical manifestations of *K. pneumoniae* bloodstream infections. *Emerg. Infect. Dis*. 2007;13(7):986–93. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1307.070187>
- Tochilina A.G., Belova I.V., Solov'eva I.V., et al. Molecular typing of hospital strains of *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae*. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2019;21(S1):63–4. EDN: <https://www.elibrary.ru/ikfgvt>
- Kuz'menko S.A., Brezhneva N.I., Goncharov A.E., Tutel'yan A.V. Features of nosocomial *Klebsiella pneumoniae* population. *Fundamental and Clinical Medicine*. 2019;4(2):58–65. DOI: <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2019-4-2-58-65> EDN: <https://www.elibrary.ru/fwfxlj>
- Kondratenko T.A., Sheozheva A.V. Monitoring of the microbiocenosis in newborns within intensive care units. *Preventive and Clinical Medicine*. 2018;(2):31–3. EDN: <https://www.elibrary.ru/xwtogh>

Information about the authors

Tatyana F. Stepanova — D. Sci. (Med.), Professor, Director, Tyumen Research Institute of Regional Infectious Pathology, Tyumen, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6289-6274>

Lyubov V. Kataeva — D. Sci. (Med.), chief researcher, Head, Bacteriological laboratory, Tyumen Research Institute of Regional Infectious Pathology, Tyumen, Russia, info@tniikip.rosпотребнадзор.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9966-8454>

Olga V. Posoyuznykh — biologist, Bacteriological laboratory, Tyumen Research Institute of Regional Infectious Pathology, Tyumen, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4364-9868>

Alexander G. Bogun — Cand. Sci. (Biol.), Head, Department of collection cultures, State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5454-2495>

Angelina A. Kislichkina — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Department of collection cultures, State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8389-2494>

Tran Thi Nhai — researcher, Joint Russian-Vietnamese Tropical Research and Technology Center (Tropical Center), Hanoi, Vietnam <https://orcid.org/0009-0003-1892-3241>

Author contributions. All authors made a significant contribution to the search and analytical work and preparation of the article, read and approved the final version before publication.

The article was submitted 22.12.2022;
accepted for publication 01.03.2023;
published 28.04.2023

Информация об авторах

Степанова Татьяна Федоровна — д.м.н., проф., директор Тюменского научно-исследовательского института краевой инфекционной патологии, Тюмень, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6289-6274>

Катаева Любовь Владимировна — д.м.н., г.н.с., зав. бактериологической лабораторией Тюменского научно-исследовательского института краевой инфекционной патологии, Тюмень, Россия, info@tniikip.rosпотребнадзор.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9966-8454>

Посоюзных Ольга Викторовна — биолог бактериологической лаборатории Тюменского научно-исследовательского института краевой инфекционной патологии, Тюмень, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4364-9868>

Богун Александр Геннадьевич — к.б.н., зав. отделом коллекционных культур ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболensk, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5454-2495>

Кисличкина Ангелина Александровна — к.б.н., с.н.с. отдела коллекционных культур ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболensk, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8389-2494>

Tran Thi Nhai — н.с. Совместного Российско-Вьетнамского тропического научно-исследовательского и технологического центра (Тропический центр), Ханой, Вьетнам, <https://orcid.org/0009-0003-1892-3241>

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

Статья поступила в редакцию 22.12.2022;
принята к публикации 01.03.2023;
опубликована 28.04.2023

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-353>



Разработка метода молекулярного субтипирования *Bacillus anthracis* с использованием HRM-ПЦР

Печковский Г.А.^{1✉}, Еременко Е.И.¹, Рязанова А.Г.¹, Писаренко С.В.¹, Шапаков Н.А.¹, Аксенова Л.Ю.¹, Семенова О.В.¹, Тимченко Л.Д.², Куличенко А.Н.¹

¹Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия;

²Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Россия

Аннотация

Введение. *Bacillus anthracis* — возбудитель сибирской язвы, патоген, характеризующийся высокой генетической мономорфностью, затрудняющей дифференциацию штаммов, в связи с чем актуальна разработка эффективных методов молекулярного типирования.

Цель исследования. Выбор маркерных однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) для типирования генетических групп *B. anthracis* и разработка метода их лабораторного определения с использованием HRM-ПЦР.

Материалы и методы. Выравнивание корового генома 222 штаммов *B. anthracis* из базы данных GenBank и 66 штаммов из коллекции патогенных микроорганизмов ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора проводили с использованием программы «Parsnp». Дендрограмму на основе 7242 SNP корового генома построили в программе «MEGA X». Штаммы для валидации метода HRM включали представителей различных генетических групп. Реакцию HRM-ПЦР проводили с использованием наборов «Type-it HRM PCR Kit» и «KAPA HRM FAST qPCR Kit» на амплификаторе ДНК «Rotor Gene» с функцией HRM. Анализ и визуализацию данных выполняли пользовательскими скриптами в среде разработки языка Python и языка R.

Результаты и обсуждение. Определены маркерные SNP для 6 генетических групп *B. anthracis*, позволяющие определять принадлежность штаммов к одному из 7 новых субкластеров. Подобраны пары праймеров, оптимизированы параметры HRM-ПЦР для дискриминации разных аллелей SNP-локусов и разработана схема анализа.

Заключение. Таким образом, выбраны маркерные SNP для определения генетических субкластеров *B. anthracis* A.Br.CEA, A.Br.ST1, A.Br.Tsiankovskii, B.Br.Europe, B.Br.Siberia, B.Br.Asia, B.Br.018 и разработан новый лабораторный метод молекулярного субтипирования *B. anthracis* с использованием HRM-ПЦР.

Ключевые слова: *генотипирование, SNP, HRM, Bacillus anthracis, полногеномное секвенирование, филогенетический анализ*

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: Печковский Г.А., Еременко Е.И., Рязанова А.Г., Писаренко С.В., Шапаков Н.А., Аксенова Л.Ю., Семенова О.В., Тимченко Л.Д., Куличенко А.Н. Разработка метода молекулярного субтипирования *Bacillus anthracis* с использованием HRM-ПЦР. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(2):178–187. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-353> EDN: <https://www.elibrary.ru/mnlmptr>

Original Study Article
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-353>

Development of a method for molecular subtyping *Bacillus anthracis* using HRM PCR

Grigorii A. Pechkovskii^{1✉}, Evgeny I. Eremenko¹, Alla G. Ryazanova¹, Sergey V. Pisarenko¹, Nikolay A. Shapakov¹, Lyudmila Yu. Aksenova¹, Olga V. Semenova¹, Lyudmila D. Timchenko², Alexandr N. Kulichenko¹

¹Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia;

²North-Caucasus Federal University, Stavropol, Russia

Abstract

Introduction. *Bacillus anthracis* is the causative agent of anthrax, a pathogen characterized by high genetic monomorphism that complicates differentiation of strains. Thus, molecular methods for pathogen typing require the improvement.

The aim of the study. To select marker SNPs for new genetic groups of *B. anthracis* and to develop a method for their laboratory identification using HRM PCR.

Materials and methods. The core genome of 222 strains of *B. anthracis* from the GenBank database and 66 strains from the collection of pathogenic microorganisms of the Stavropol Anti-Plague Institute was aligned using the parsnp software. A dendrogram based on 7242 core genome SNPs was built in MEGA X software. The strains for validation of the HRM method included representatives of various genetic groups. The HRM PCR reaction was performed using the "Type-it HRM PCR Kit" and "KAPA HRM FAST qPCR Kit" and a Rotor Gene DNA thermocycler with HRM function. Data analysis and visualization were performed using custom scripts in the Python and R development environments.

Results and discussion. Marker SNPs for 6 genetic groups have been identified, which make it possible to determine whether strains belong to one of 7 new subclusters. Pairs of primers were selected for the loci containing them, HRM PCR parameters were optimized for discrimination of different alleles of SNP loci, and an analysis scheme was developed.

Conclusion. Thus, marker SNPs were selected to determine the genetic subclusters A.Br.CEA, A.Br.STI, A.Br. Tsiankovskii, B.Br.Europe, B.Br.Siberia, B.Br.Asia, B.Br.018, and a new laboratory method was developed for molecular subtyping of *B. anthracis* using HRM PCR.

Keywords: genotyping, SNP, HRM, *Bacillus anthracis*, whole genome sequencing, phylogenetic analysis

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: Pechkovskii G.A., Eremanko E.I., Ryazanova A.G., Pisarenko S.V., Shapakov N.A., Aksenova L.Y., Semenova O.V., Timchenko L.D., Kulichenko A.N. Development of a method for molecular subtyping *Bacillus anthracis* using HRM PCR. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2023;100(2):178–187.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-353> EDN: <https://www.elibrary.ru/mnlmpr>

Введение

Возбудитель сибирской язвы имеет особый жизненный цикл, связанный с образованием исключительно устойчивых спор и длительным сохранением *Bacillus anthracis* в почве в покоящемся состоянии. В результате накопление мутаций ограничивается относительно редкими событиями инфицирования организма чувствительного хозяина, что приводит к небольшим генетическим вариациям внутри вида [1].

Несмотря на высокую генетическую однородность *B. anthracis*, выбраны и широко используются маркеры для генотипирования: VNTR (тандемные повторы) [2], SNR (однонуклеотидные повторы) [3] и SNP (однонуклеотидные полиморфизмы) [4].

SNP являются более стабильными генетическими маркерами, степень обратных мутаций и гомоплазии существенно меньше, чем, например, для VNTR, что удобно при изучении эволюции бактерии и определении специфических генетических линий штаммов [5]. Такие особенности способствуют активному поиску и обнаружению информативных SNP.

Первые SNP *B. anthracis* были описаны при секвенировании изолятов штамма Ames, изолиро-

ванного из биологического материала жертвы атаки 2001 г. (штамм Florida) и от лабораторного штамма (штамм Porton). Сравнение штаммов показывало их высокое родство [6]. Отбор SNP и их проверка на 88 штаммах *B. anthracis* позволили выявить 6 специфических для группы Ames SNP, 4 хромосомных, а также по одной для плазмид pXO1 и pXO2 [7].

В глобальном исследовании 1033 штаммов *B. anthracis* из 42 стран группой исследователей во главе с Van Ert были открыты 13 «канонических» SNP, разделяющих штаммы *B. anthracis* на 12 генетических групп. Каноническое генотипирование является ключевым и широко используется в генотипировании [4]. Позже был найден дополнительный SNP A.Br.011, который разделит самую многочисленную группу A.Br.008/009 на подгруппы A.Br.008/011 и A.Br.011/009 [8].

Группа японских исследователей на основе 19 полногеномных сиквенсов, в том числе 2 японских штаммов, классифицировали 2965 SNP на 80 групп SNP (tag типов) и выбрали среди них 3 специфических для штаммов из Японии [9].

Новые SNP помогают в эпидемиологической расшифровке вспышек сибирской язвы; так, при инциденте заражения *B. anthracis* через инъекции

героина были секвенированы геном штамма Va4599 от пациента и 2 генома близкородственных штамма из Турции. При сравнении геномов были найдены специфичные SNP для этой вспышки, а также для дополнительного разделения группы A.Br.008 [10].

Таким образом, уже описаны 13 канонических и по меньшей мере 57 дополнительных SNP, специфичных к определённым генетическим группам [4, 6–17]. В то же время было известно, что родственные генетические линии могут находиться на достаточно большом географическом расстоянии. Например, группа A.Br.008/009 встречается в странах Европы, Азии и Южной Америки, а линия A.Br.Aust.94 — в Австралии, странах Азии и Африки. С накоплением штаммов различного географического происхождения закономерным было увеличение количества генетических групп [4]. В частности, при исследовании 193 геномов *B. anthracis* на основе 5663 парсимоничных SNP выделили 16 основных генетических групп и 330 ветвей с указанием специфичных SNP для групп штаммов и отдельных штаммов [18]. В результате возникает необходимость в идентификации новых специфичных маркеров и разработке метода их определения.

SNP-генотипирование проводится преимущественно методами аллель-специфичной амплификации (TaqMan MGB (Minor Groove Binder), LNA, Melt-MAMA) и плавлением ампликонов с высоким разрешением (High Resolution Melting, HRM) ПЦР [19–21]. Для проведения TaqMan MGB и LNA используют специфичные зонды для SNP. Melt-MAMA основана на соответствии/несоответствии специальных праймеров к локусу с SNP. Принцип HRM-ПЦР построен на детекции разницы температур плавления ампликонов. Чувствительность метода достигает одного нуклеотида, благодаря чему с помощью HRM-анализа можно проводить детекцию SNP [22]. SNP- и VNTR-локусы применяются для комбинированного генотипирования штаммов методами HRM-ПЦР [23].

С появлением методов высокопроизводительного секвенирования полных геномов (WGS) основным подходом к определению генетического родства штаммов стал анализ SNP корового генома (WGS-SNP-типирование). WGS-SNP-типирование, хотя и позволяет получить исчерпывающую информацию о геномах исследуемых штаммов, является достаточно дорогим и требующим наличия соответствующего оборудования [24].

Данное исследование является логическим продолжением работы [25]. В ней на основе WGS-SNP-анализа корового генома набора штаммов были подробно описаны генетические сублинии, распространённые на территории России и приграничных стран. В ходе исследования было выяснено, что из 66 исследованных штаммов в коллек-

ции патогенных микроорганизмов Ставропольского противочумного института Роспотребнадзора 49 относились к линии А, остальные 17 штаммов — к линии В. Штаммы линии А неравномерно распределялись между 5 каноническими группам. Больше всего, 35 штаммов, относилось к группе A.Br.008/011, 6 штаммов — к A.Br.Ames, 5 штаммов — к A.Br.Aust94, 2 штамма — к A.Br.001/002, 1 штамм — к A.Br.005/006. Все штаммы основной линии В принадлежали к канонической группе B.Br.001/002. Наиболее типичными для территории России и ближайших стран, имеющими наибольшую эпидемиологическую значимость, являются генетические субкластеры A.Br.STI, A.Br.Tsiankovskii в группе A.Br.008/011, а также новые — A.Br.CEA в группе A.Br.Aust94 и B.Br.Europe, B.Br.Siberia, B.Br.Asia, B.Br.018 в группе B.Br.001/002. Однако метод молекулярного субтипирования для дифференциации этих субкластеров без использования WGS-SNP не разработан.

Цель исследования — выбор маркерных SNP для типирования генетических субкластеров *B. anthracis* и разработка метода в формате HRM-ПЦР для их лабораторного определения.

Материалы и методы

Для построения дендрограммы было использовано 222 генома из коллекции GenBank и 66 геномов штаммов из коллекции патогенных микроорганизмов Ставропольского противочумного института Роспотребнадзора.

Коровое выравнивание осуществлялось с помощью программ «Parsnp» из пакета Harvest suit с референсным геномом Ames Ancestor (GCF_000008445.1). Из коровых SNP удаляли позиции, имеющие неизвестный нуклеотид «N». Далее SNP из файла VCF конкатенировали в файл FASTA. Филогенетическое дерево строили в программе «MEGA X» методом максимального правдоподобия с моделью замен Tamura-Nei.

SNP группировали в типы алгоритмом на основе языка программирования Python с модулями pandas, numpy, scipy и matplotlib.

Праймеры подбирали в программе «Primer-BLAST»¹ и синтезировали в Ставропольском противочумном институте.

ДНК *B. anthracis* получали согласно МУ 1.3 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Штаммы для валидации метода HRM включали представителей различных генетических групп.

Реакцию ПЦР для маркеров *snp cea*, *snp sti*, *snp tsian* проводили набором «Type-it HRM PCR

¹ URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>

Kit» («Qiagen»), а для маркеров snp.sib, snp.eursib, snp.012 — «КАРА HRM FAST qPCR Kit» («Roche»). ПЦР-смесь готовили согласно инструкциям к наборам. Количество праймеров в реакции — 0,3 мкМ. Режим термоциклирования: первый этап — активация — 95°C 5 мин 1 цикл, второй этап — денатурация 95°C 10 с, отжиг 56°C 30 с, элонгация 72°C 10 с — 45 циклов, 3 этап — плавление от 60 до 85°C.

Анализ кривых плавления выполняли в среде разработки языка Python с модулями numpy, scipy, pandas. При анализе данных плавления последовательно использовали операции: интерполяция, вычисление производной, сглаживание и нормализация. Интерполяция данных производилась функциями numpy.linspace() и scipy.interpolate.make_interp_spline().

Производную вычисляли при помощи функции numpy.diff() и формулы $-dF/dT$, где F — массив данных флуоресценции, T — массив данных температур. Сглаживание данных осуществляли функцией numpy.convolve(). Нормализацию выполняли методом Max–Min с формулой:

$$(X - X_{\min}) / (X_{\max} - X_{\min}),$$

где X — массив данных флуоресценции.

Сопоставление найденных генетических групп с филогенетической дендрограммой и визуализацию данных осуществляли в среде языка R с библиотеками ggtree и ggplot2.

Результаты и обсуждение

Исследование состояло из двух этапов: биоинформатического анализа геномных данных и

создания лабораторной методики молекулярного субтипирования *B. anthracis* с использованием HRM-ПЦР.

Биоинформатический анализ геномных данных

На первом этапе исследования было выполнено коровое выравнивание на основе 288 геномов *B. anthracis* различных генетических групп. В итоге получены 7242 коровых SNP, на их основе построена филогенетическая дендрограмма.

Найденные SNP группировали в типы SNP. Тип SNP можно определить как SNP, разделяющие геномы штаммов на одинаковые подмножества, при этом одно подмножество имеет специфический нуклеотид, другое — альтернативный. Таким образом, один тип SNP обладает одинаковой специфичностью. Технически типом SNP являются SNP с одинаковым набором 0 или 1 (референсных и альтернативных нуклеотидов) в строках VCF-файла. В алгоритме группировки сначала определяются уникальные группы строк, затем каждой уникальной группе и соответствующим отдельным SNP присваивается название (тег или номер SNP). Найденные типы SNP сопоставляли с дендрограммой, построенной на основании SNP корового выравнивания, и определяли их специфичность (рис. 1).

Нами было сгруппировано 7242 SNP в 485 типов, из них 6 типов позволяли выделить субкластеры A.Br.CEA, A.Br.STI, A.Br.Tsiankovskii, B.Br.Europe, B.Br.Siberia, B.Br.Asia, B.Br.018. Из каждого типа отобрано по одному маркерному SNP (табл. 1). К локусам, содержащим маркерные SNP,

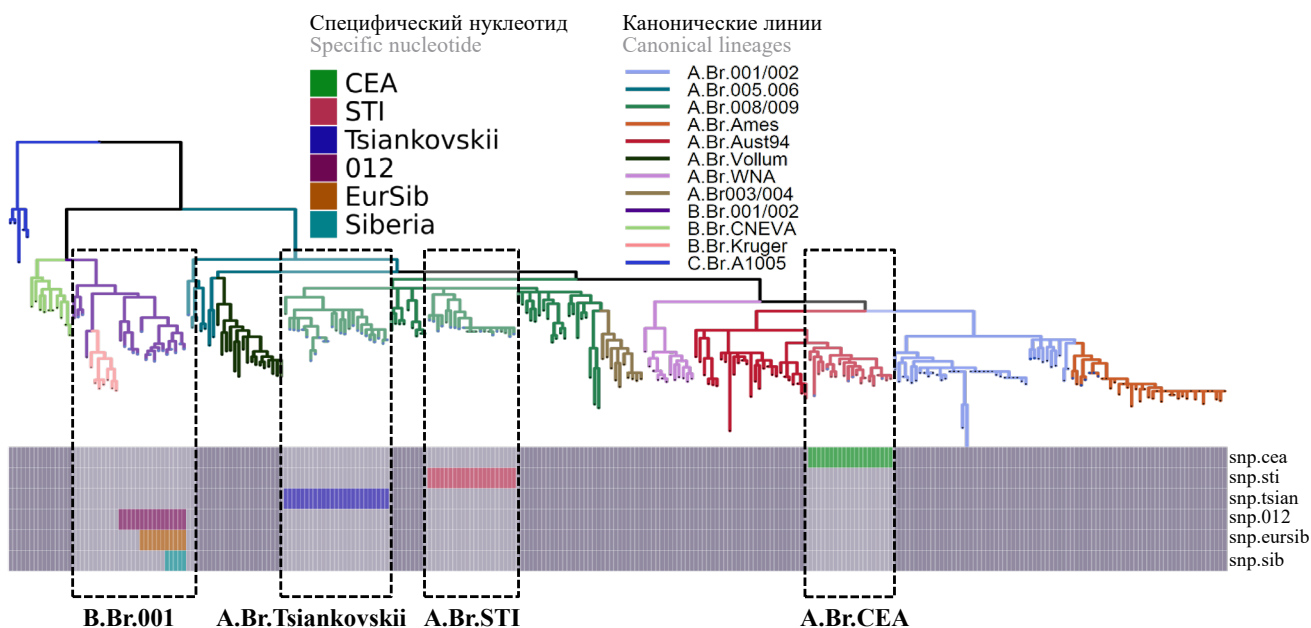


Рис. 1. Сопоставление филогенетической дендрограммы и специфических SNP.

Fig. 1. Comparison of the phylogenetic dendrogram and the specific SNPs.

Таблица 1. Маркерные SNP, позволяющие дифференцировать субкластеры *B. anthracis***Table 1.** Marker SNPs enabling identification of *B. anthracis* subclusters

Субкластер Subcluster	Тип SNP Type of SNP	Позиции SNP в геноме референс-штамма Ames Ancestor и замена SNP positions in the genome of Ames Ancestor reference strains and substitution
A.Br.CEA	snp.cea	3640599(C→T) ; 4129922
A.Br.STI	snp.sti	3477612(T→C) ; 5018646; 5182989
A.Br.Tsiankovskii	snp.tsian	1512630; 1570595; 1669436; 3462463(A→G) ; 3535633
B.Br.Siberia	snp.sib	852412; 1154559(G→A) ; 1718548; 3478630
B.Br.Europe B.Br.Siberia	snp.eursib	401345; 845118; 924463; 1091101; 1275037; 1340610(C→A) ; 1370064; 1707494; 1845295; 1995289; 2203604; 2869433; 3370298; 3434429; 3445848; 3676855; 3744240; 3779450; 3996031; 4010553; 4087470; 4099116; 4289474; 4301537; 4374768; 4425661; 4516984; 4741119; 4814382; 5002952; 5195702
B.Br.Europe B.Br.Siberia B.Br.Asia	snp.012	5161369(C→A)

Примечание. Выделены маркерные SNP, подчеркнута маркерная аллель.

Note. Marker SNPs are shown in bold, marker alleles are underlined.

разработаны праймеры (**табл. 2**). Snp.cea.3640599 был описан в исследовании с лабораторной методикой определения Melt-МАМА [14].

Молекулярное субтипирование *B. anthracis* с использованием HRM-ПЦР

На втором этапе исследования разрабатывался HRM-ПЦР-метод. Оптимизирован протокол проведения HRM-ПЦР, включающий режим термоциклирования и параметры реакции.

Для тестирования разработанного метода были использованы штаммы из различных специфических субкластеров и канонических линий (**табл. 3, 4**). Принадлежность к определённым каноническим и неканоническим генетическим линиям определялась по результатам ранее проведённого канонического типирования или полногеномного секвенирования. Отметим, что специфическая группа штаммов линии A.Br.Aust94 включала штаммы с уже известным генотипом A.Br.CEA по результатам секвенирования: 312/163, 73/42, 819/5, и неизвестным генотипом: 377/3, 456/13, 1180, 1190, 1283, 52/33, 462/471, 817/685. Штаммы специфической группы были выделены в процессе вспышек на территории Кавказа (Кабардино-Балкарская Республика, Республика Дагестан, Ставропольский край, Республика Ингушетия, Чеченская Республика, Азербайджан, Грузия).

Для типирования штаммов *B. anthracis* предлагается схема, в которой на первом этапе проводится типирование основных канонических линий, а на втором — дополнительное типирование. В частности, если определяется каноническая линия A.Br.008/009, то необходимо провести дополнительное типирование SNP snp.sti и snp.tsian, при выявлении A.Br.Aust94 — snp.cea, а при идентификации V.Br.001/002 — snp.sib, snp.eursib, snp.012.

Нужно отметить, что при типировании группы V.Br.001/002 используется комбинация SNP: snp.sib, характерный для кластера V.Br.Siberia, snp.eursib — для кластеров V.Br.Siberia и V.Br.Europe, snp.012 — для кластеров V.Br.Siberia, V.Br.Europe и V.Br.Asia. При типировании комбинации 3 SNP удастся выделить 4 группы (V.Br.Europe, V.Br.Siberia, V.Br.Asia, V.Br.018) из линии V.Br.001/002 с характерным набором нуклеотидов (**табл. 5**), что позволяет уменьшить количество ПЦР-реакций и более точно определять специфические группы.

В результате проведения тестирования были получены кривые плавления, произведён анализ кривых плавления и получены пики плавления.

Для snp.cea температура пика плавления ДНК штаммов специфической группы составила $71,06 \pm 0,08^\circ\text{C}$, а для неспецифической — $71,54 \pm 0,05^\circ\text{C}$. Температуры специфических групп для snp.sti и snp.tsian были равны $70,43 \pm 0,07$ и $71,63 \pm 0,09^\circ\text{C}$,

Таблица 2. Праймеры к SNP-локусам *B. anthracis***Table 2.** Primers for *B. anthracis* SNP loci

SNP-локус SNP locus	Прямой праймер Forward primer	Обратный праймер Reverse primer
snp.cea.3640599	ACACCTAAACCTTCTTTAATACATCT	ATTGACCCAACAGCTACGAA
snp.sti.3477612	GCAAATGGCTCTATTTCTGATT	ACAACGAAAAGATTATCCAAAGTA
snp.tsian.3462463	ACACCACAAATACAAAAACCT	TCTCTGATACTTCTAATCTGTTCTGT
snp.012.5161369	TTTATTAGCAGGAGAACGTAGAAT	AATGCAACGAATGTAATGAAACAT
snp.eursib.1340610	CAAGGCATGAACAAGGAGCTA	AACCCCTGGATTGCCAGTAA
snp.sib.1154559	AGGCTTAGCAAAAAGTCCGA	GCTTCCGTTTTCTTCCAGG

Таблица 3. Результаты тестирования штаммов *B. anthracis* (локусы — snp.cea, snp.sti, snp.tsian) методом HRM-ПЦП
Table 3. Results of testing of *B. anthracis* strains (loci — snp.cea, snp.str, snp.tsian) by HRM PCR

Группа A.Br.CEA A.Br.CEA group			Группа A.Br.STI и A.Br.Tsiankovskii A.Br.STI and A.Br.Tsiankovskii group			
№ штамма No. strain	линии lineages	snp.cea, t°C	№ штамма No. strain	линии lineages	snp.sti, t°C	snp.tsian, t°C
I-45	A.Br.001/002	71,57	I-45	A.Br.001/002	69,91	70,90
1	A.Br.005/006	71,57	1	A.Br.005/006	69,91	70,99
81/1	A.Br.008/009	71,53	I-357	A.Br.Ames	70,00	70,99
I-19	A.Br.008/009	71,62	388/1	A.Br.Vollum	69,90	71,00
I-357	A.Br.Ames	71,48	140P	B.Br.001/002	69,90	70,90
388/1	A.Br.Vollum	71,48	I-29	B.Br.001/002	69,80	70,90
140P	B.Br.001/002	71,57	1368/1	B.Br.001/002	69,81	70,99
I-29	B.Br.001/002	71,53	312/163	A.Br.Aust94	69,80	70,80
1368/1	B.Br.001/002	71,47	81/1	A.Br.STI	69,90	71,60
312/163	A.Br.CEA	70,93	1CO	A.Br.STI	69,70	71,70
819/5	A.Br.CEA	71,03	363/17	A.Br.STI	69,80	71,60
73/42	A.Br.CEA	71,08	506/55	A.Br.STI	69,80	71,59
377/3	A.Br.CEA	70,97	I-9	A.Br.STI	70,09	71,71
456/13	A.Br.CEA	71,03	228/269	A.Br.STI	69,91	71,79
1180	A.Br.CEA	70,97	618/755	A.Br.Tsian.	70,51	70,89
1190	A.Br.CEA	71,13	1058/654	A.Br.Tsian.	70,59	70,90
1283	A.Br.CEA	71,07	I-19	A.Br.Tsian.	70,41	70,99
52/33	A.Br.CEA	71,07	I-275	A.Br.Tsian.	70,41	70,90
462/471	A.Br.CEA	71,17	I-323	A.Br.Tsian.	70,59	71,00
817/685	A.Br.CEA	71,17	1374/873	A.Br.Tsian.	70,51	70,99

Примечание. Выделены температуры пиков плавления, демонстрирующие специфические реакции при тестировании штаммов разных линий *B. anthracis*.

Note. The melting peak temperatures are indicated in bold, demonstrating specific reactions when testing strains of different *B. anthracis* lineages.

Таблица 4. Результаты HRM-ПЦП-тестирования штаммов для локусов snp.sib, snp.eursib, snp.012
Table 4. Results of HRM PCR testing of strains for loci snp.sib, snp.eursib, snp.012 loci

Группы тестирования B.Br.Siberia, B.Br.Eursib и B.Br.012 B.Br.Sib, B.Br.Eursib, and B.Br.012 testing group				
№ штамма No. strain	линии lineages	snp.sib, t °C	snp.eursib, t °C	snp.012, t °C
I-45	A.Br.001/002	74,61	79,09	70,80
81/1	A.Br.008/009	74,41	79,20	70,90
312/163	A.Br.Aust94	74,51	79,21	71,09
140P	B.Br.Europe	74,60	78,41	70,00
12/16	B.Br.Europe	74,60	78,41	69,70
850/46	B.Br.Europe	74,60	78,41	69,69
I-373	B.Br.Europe	NA	78,51	69,81
1342/12	B.Br.Siberia	73,81	78,50	69,80
I-29	B.Br.Siberia	73,80	78,59	69,99
1368/1	B.Br.Asia	74,60	79,21	69,70
I-362	B.Br.Asia	74,71	79,30	69,71
1284	B.Br.018	74,71	79,30	71,00

Примечание. NA — штамм не тестировался. Жирным шрифтом указаны температуры пиков плавления, демонстрирующие специфические реакции при тестировании штаммов разных линий *B. anthracis*.

Note. NA — strain not tested. The melting peak temperatures are indicated in bold, demonstrating specific reactions when testing strains of different *B. anthracis* lineages.

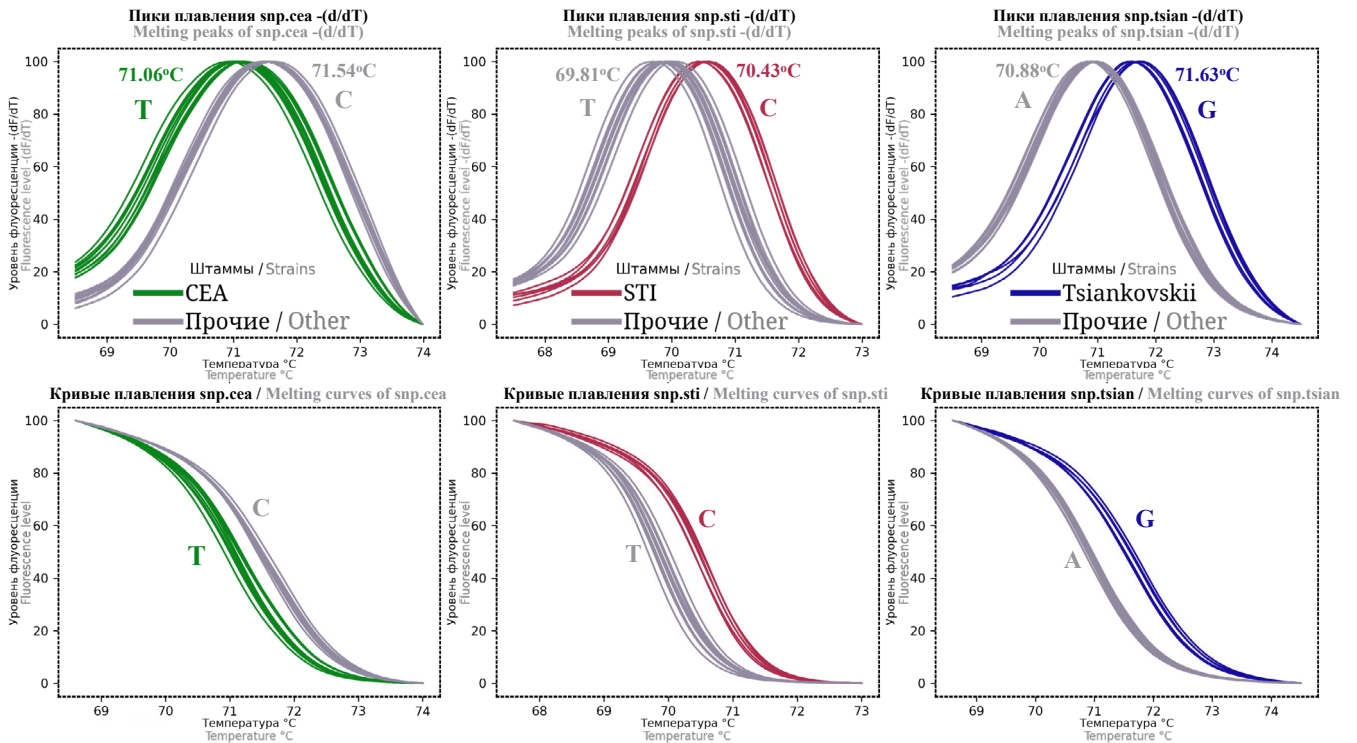


Рис. 2. Пики и кривые плавления штаммов A.Br.CEA, A.Br.STI и A.Br.Tsiankovskii для соответствующих локусов snp.cea, snp.sti, snp.tsian.

Fig. 2. Peaks and melting curves for strains from A.Br.CEA, A.Br.STI and A.Br.Tsiankovskii clusters for the corresponding snp.cea, snp.sti, and snp.tsian loci.

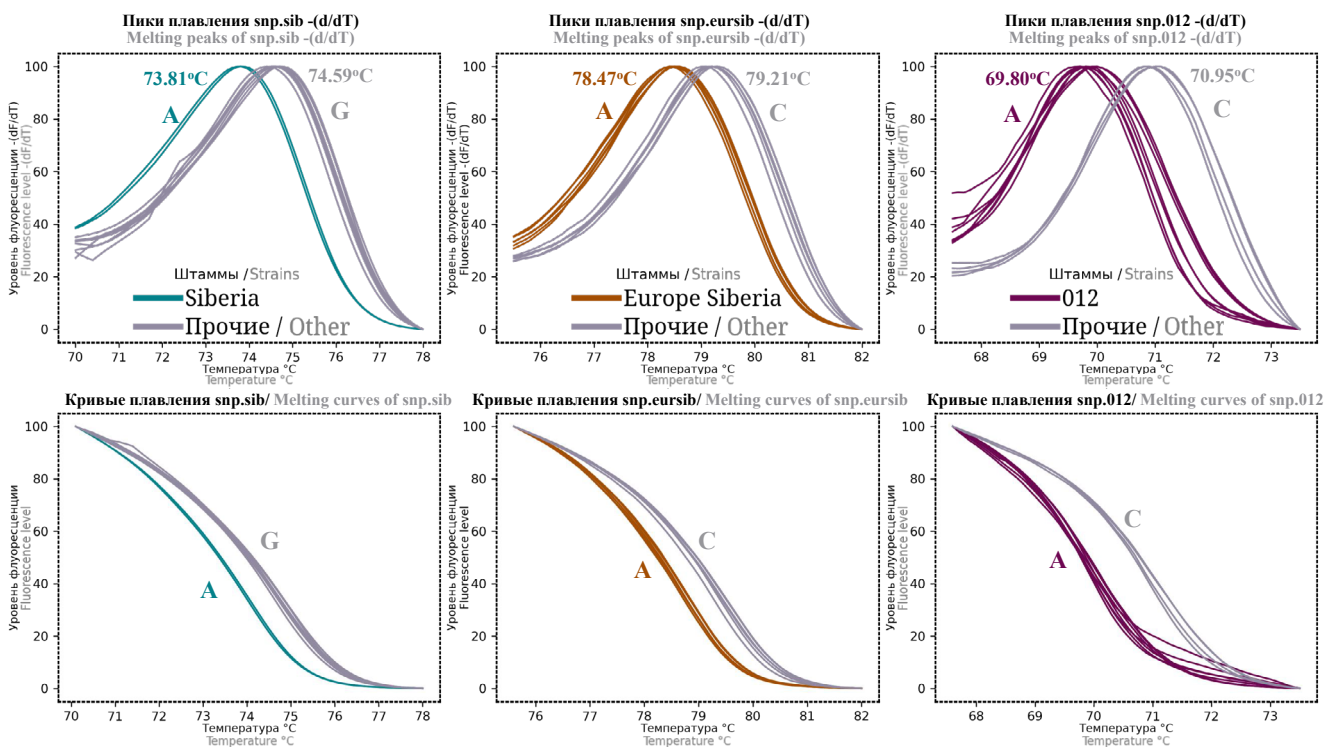


Рис. 3. Пики и кривые плавления при анализе штаммов кластеров B.Br.Siberia, B.Br.Europe и B.Br.Siberia, B.Br.012 по соответствующим локусам snp.sib, snp.eursib и snp.012.

Fig. 3. Peaks and melting curves for strains from B.Br.Siberia, B.Br.Europe, and B.Br.012 clusters for the corresponding snp.sib, snp.eursib, and snp.012 loci.

Таблица 5. Набор нуклеотидов SNP для специфических субкластеров *B. anthracis*

Table 5. Set of SNP nucleotides specific for different *B. anthracis* subclusters

Субкластер Subcluster	Алели маркерных SNP Alleles of marker SNPs					
	snp.cea	snp.sti	snp.tsian	snp.sib	snp.eursib	snp.012
A.Br.CEA	I	T	A	G	C	C
A.Br.STI	C	C	A	G	C	C
A.Br.Tsiankovskii	C	T	G	G	C	C
B.Br.Siberia	C	T	A	A	A	A
B.Br.Europe	C	T	A	G	A	A
B.Br.Asia	C	T	A	G	C	A
B.Br.018	C	T	A	G	C	C

Примечание. Жирным шрифтом с подчеркиванием выделен специфический нуклеотид.

Note. A specific nucleotide is highlighted in bold with an underscore.

Таблица 6. Пики плавления SNP-локусов

Table 6. Melting peaks for SNP loci

Локус Locus	Нуклеотид Nucleotide	Пики температур плавления, °C Melting temperature peaks, °C	Разница пиков температур плавления, °C Difference of melting temperature peaks, °C
snp.cea	I	71,06 ± 0,08	0,48
	C	71,54 ± 0,05	
snp.sti	C	70,43 ± 0,07	0,63
	T	69,81 ± 0,08	
snp.tsian	G	71,63 ± 0,09	0,76
	A	70,88 ± 0,07	
snp.sib	A	73,81 ± 0,01	0,79
	G	74,59 ± 0,09	
snp.eursib	A	78,47 ± 0,07	0,74
	C	79,21 ± 0,08	
snp.012	A	69,80 ± 0,13	1,15
	C	70,95 ± 0,12	

Примечание. Жирным шрифтом с подчеркиванием выделен специфический нуклеотид.

Note. A specific nucleotide is highlighted in bold with an underscore.

а неспецифических — $69,81 \pm 0,08$ и $70,88 \pm 0,07^\circ\text{C}$ соответственно (табл. 3, 6, рис. 2). Локусы snp.012, snp.eursib, snp.sib демонстрировали температуру плавления для специфических аллелей, равную $69,80 \pm 0,13$, $78,47 \pm 0,07$ и $73,81 \pm 0,01^\circ\text{C}$ соответственно; для неспецифических — $70,95 \pm 0,12$, $79,21 \pm 0,08$ и $74,59 \pm 0,09^\circ\text{C}$ соответственно (табл. 5, 6, рис. 3).

Определённые генотипы методом HRM-ПЦР в 100% случаев совпадали с генотипами, определёнными в результате полногеномного секвенирования.

Следует отметить, что абсолютные значения кривых и пиков плавления зависят от используемого набора и параметров реакции, но разница в температурах остаётся относительно постоянной.

Ранее нами было показано, что к субкластеру A.Br.CEA canSNP-группы A.Br.Aust94 принадлежат штаммы *B. anthracis*, выделенные на территории

Южного Кавказа и Турции, а также один штамм 73/42, выделенный на Северном Кавказе в Чечено-Ингушской АССР, что дало основание назвать этот субкластер A.Br.CEA (Caucasus-East Anatolia). Тогда же нами было выдвинуто предположение, что многие штаммы из коллекции патогенных микроорганизмов Ставропольского противочумного института Роспотребнадзора, выделенные на Кавказе, могут относиться к этому субкластеру [24]. В результате типирования разработанным методом установлено, что все штаммы из группы A.Br.Aust94 принадлежали к субкластеру A.Br.CEA, что подтверждает распространение A.Br.CEA по территории Северного и Южного Кавказа.

Таким образом, выбраны маркерные SNP для определения генетических субкластеров A.Br.CEA, A.Br.STI, A.Br.Tsiankovskii, B.Br.Europe, B.Br.Siberia, B.Br.Asia, B.Br.018 и разработан новый лабораторный метод молекулярного субтипирования

B. anthracis с использованием HRM-ПЦР. Использование этого метода молекулярного субтипирования в алгоритме мониторинга возбудителя сибирской язвы позволяет определить принадлежность изолятов *B. anthracis* к одному из наиболее распространённых и эпидемиологически значимых субкластеров до получения результатов полногеномного секвенирования и филогенетического анализа.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Pilo P., Frey J. *Bacillus anthracis*: molecular taxonomy, population genetics, phylogeny and patho-evolution. *Infect. Genet. Evol.* 2011;11(6):1218–24. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.05.013>
- Beyer W., Bellan S., Eberle G., et al. Distribution and molecular evolution of *Bacillus anthracis* genotypes in Namibia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012;6(3):e1534. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001534>
- Stratilo C.W., Lewis C.T., Bryden L., et al. Single-nucleotide repeat analysis for subtyping *Bacillus anthracis* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2006;44(3):777–82. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.44.3.777-782.2006>
- Van Ert M.N., Easterday W.R., Huynh L.Y., et al. Global genetic population structure of *Bacillus anthracis*. *PLoS One.* 2007;2(5):e461. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000461>
- Pearson T., Busch J.D., Ravel J., et al. Phylogenetic discovery bias in *Bacillus anthracis* using single-nucleotide polymorphisms from whole-genome sequencing. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2004;101(37):13536–41. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0403844101>
- Read T.D., Salzberg, S.L., Pop M., et al. Comparative genome sequencing for discovery of novel polymorphisms in *Bacillus anthracis*. *Science.* 2002;296(5575):2028–33. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1071837>
- Van Ert M.N., Easterday W.R., Simonson T.S., et al. Strain-specific single-nucleotide polymorphism assays for the *Bacillus anthracis* Ames strain. *J. Clin. Microbiol.* 2007;45(1):47–53. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.01233-06>
- Marston C.K., Allen C.A., Beaudry J., et al. Molecular epidemiology of anthrax cases associated with recreational use of animal hides and yarn in the United States. *PLoS One.* 2011;6(12):e28274. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028274>
- Kuroda M., Serizawa M., Okutani A., et al. Genome-wide single nucleotide polymorphism typing method for identification of *Bacillus anthracis* species and strains among *B. cereus* group species. *J. Clin. Microbiol.* 2010;48(8):2821–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.00137-10>
- Price E.P., Seymour M.L., Sarovich D.S., et al. Molecular epidemiologic investigation of an anthrax outbreak among heroin users, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 2012;18(8):1307. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1808.111343>
- Girault G., Blouin Y., Vergnaud G., Derzelle S. High-throughput sequencing of *Bacillus anthracis* in France: investigating genome diversity and population structure using whole-genome SNP discovery. *BMC Genomics.* 2014;15(1):288. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-288>
- Girault G., Thierry S., Cherchame E., Derzelle S. Application of high-throughput sequencing: discovery of informative SNPs to subtype *Bacillus anthracis*. *Adv. Biosci. Biotech.* 2014;5(7):669–77. DOI: <https://doi.org/10.4236/abb.2014.57079>
- Derzelle S., Aguilar-Bultet L., Frey J. Whole genome SNP analysis of bovine *B. anthracis* strains from Switzerland reflects strict regional separation of Simmental and Swiss Brown breeds in the past. *Vet. Microbiol.* 2016;196:1–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.10.014>
- Khmaladze E., Birdsell D.N., Naumann A.A., et al. Phylogeography of *Bacillus anthracis* in the country of Georgia shows evidence of population structuring and is dissimilar to other regional genotypes. *PLoS One.* 2014;9(7):e102651. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102651>
- Sahin M., Buyuk F., Baillie L., et al. The identification of novel single nucleotide polymorphisms to assist in mapping the spread of *Bacillus anthracis* across the Southern Caucasus. *Sci. Rep.* 2018;8(1):11254. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29738-3>
- Kenefic L.J., Pearson T., Okinaka R.T., et al. Pre-Columbian origins for North American anthrax. *PLoS One.* 2009;4(3):e4813. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004813>
- Derzelle S., Aguilar-Bultet L., Frey J. Comparative genomics of *Bacillus anthracis* from the wool industry highlights polymorphisms of lineage A. Br. Vollum. *Infect. Genet. Evol.* 2016;46:50–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.10.019>
- Sahl J.W., Pearson T., Okinaka R., et al. A *Bacillus anthracis* genome sequence from the Sverdlovsk 1979 autopsy specimens. *mBio.* 2016;7(5):e01501-16. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.01501-16>
- Navarro E., Serrano-Heras G., Castaño M.J., Solera J. Real-time PCR detection chemistry. *Clin. Chim. Acta.* 2015;439:231–50. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.017>
- Johnson M.P., Haupt L.M., Griffiths L.R. Locked nucleic acid (LNA) single nucleotide polymorphism (SNP) genotype analysis and validation using real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(6):e55. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gnh046>
- Birdsell D.N., Pearson T., Price E.P., et al. Melt analysis of mismatch amplification mutation assays (Melt-MAMA): a functional study of a cost-effective SNP genotyping assay in bacterial models. *PLoS One.* 2012;7(3):e32866. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032866>
- Tamburro M., Ripabelli G. High Resolution Melting as a rapid, reliable, accurate and cost-effective emerging tool for genotyping pathogenic bacteria and enhancing molecular epidemiological surveillance: a comprehensive review of the literature. *Ann. Ig.* 2017;29(4):293–316. DOI: <https://doi.org/10.7416/ai.2017.2153>
- Анисимова Е.А., Фахрутдинов Н.А., Миргазов Д.А. и др. Дифференциация штаммов *Bacillus anthracis* на основе SNP- и VNTR-полиморфизма геномов. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2022;26(6):560–7. DOI: <https://doi.org/10.18699/VJGB-22-68> EDN: <https://www.elibrary.ru/epohdj>
- Anisimova E.A., Fakhrutdinov N.A., Mirgazov D.A., et al. *Bacillus anthracis* strain differentiation based on SNP and VNTR loci. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2022;26(6):560–7. DOI: <https://doi.org/10.18699/VJGB-22-68>
- Kwong J.C., McCallum N., Sintchenko V., Howden B.P. Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology. *Pathology.* 2015;47(3):199–210. DOI: <https://doi.org/10.1097/PAT.0000000000000235>
- Eremenko E., Pechkovskii G., Pisarenko S., et al. Phylogenetics of *Bacillus anthracis* isolates from Russia and bordering countries. *Infect. Genet. Evol.* 2021;92:104890. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104890>

Информация об авторах

Печковский Григорий Александрович[✉] — м.н.с. лаб. сибирской язвы Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, grigorii.pechkovskii@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7033-9972>

Еременко Евгений Иванович — д.м.н., проф., г.н.с. лаб. сибирской язвы Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8163-1300>

Рязанова Алла Геннадьевна — к.м.н., зав. лаб. сибирской язвы Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5196-784X>

Писаренко Сергей Владимирович — к.х.н., в.н.с. лаб. биохимии Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6458-6790>

Шапаков Николай Андреевич — м.н.с., лаб. биохимии Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9152-4026>

Аксенова Людмила Юрьевна — к.м.н., с.н.с. Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7744-3112>

Семенова Ольга Викторовна — к.б.н., н.с. лаб. сибирской язвы Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0274-898X>

Тимченко Людмила Дмитриевна — д.вет.н., проф., г.н.с. межкафедальной научно-образовательной лаборатории экспериментальной иммуноморфологии, иммунопатологии и иммунобиотехнологии Северо-Кавказского федерального университета, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2011-880X>

Куличенко Александр Николаевич — академик РАН, д.м.н., проф., директор Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9362-3949>

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

Статья поступила в редакцию 24.11.2022;
принята к публикации 30.01.2023;
опубликована 28.04.2023

Information about the authors

Grigori A. Pechkovskii[✉] — junior researcher, Anthrax laboratory, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, grigorii.pechkovskii@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7033-9972>

Evgeny I. Eremenko — D. Sci. (Med.), Professor, principal researcher, Anthrax laboratory, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8163-1300>

Alla G. Ryazanova — Cand. Sci. (Med.), Head, Anthrax laboratory, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5196-784X>

Sergey V. Pisarenko — Cand. Sci. (Chem.), leading researcher, Laboratory of biochemistry, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6458-6790>

Nikolay A. Shapakov — junior researcher, Laboratory of biochemistry, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9152-4026>

Lyudmila Yu. Aksenova — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Anthrax laboratory, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7744-3112>

Olga V. Semenova — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Anthrax laboratory, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0274-898X>

Lyudmila D. Timchenko — D. Sci. (Vet.), Professor, principal researcher, Interdepartmental scientific and educational laboratory of experimental immunomorphology, immunopathology and immunobiotechnology, North-Caucasus Federal University, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2011-880X>

Alexandr N. Kulichenko — D. Sci. (Med.), Professor, academician of RAS, director, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9362-3949>

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

The article was submitted 24.11.2022;
accepted for publication 30.01.2023;
published 28.04.2023

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-268>



Антибиотикочувствительность холерных вибрионов в сложных биоплёнках, сформированных на различных субстратах

Селянская Н.А.[✉], Титова С.В., Меньшикова Е.А.

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

Аннотация

Введение. Изучение антибиотикочувствительности биоплёнок холерных вибрионов может помочь в поиске эффективных препаратов для борьбы с холерой.

Цель работы — оценить эффективность антибактериальных препаратов в отношении клеток *Vibrio cholerae* в составе полимикробной биоплёнки, образованной на различных субстратах.

Материалы и методы. Проводили моделирование моно- и полимикробных биоплёнок *in vitro* на хитине и пластике во флаконах с водопроводной автоклавированной водой, контаминированных взвесью 10^4 микробных клеток трёх штаммов *V. cholerae* O1 El Tor отдельно и в сочетании с *Escherichia coli* QD 5003.

Результаты. В составе моно- и полимикробных бактериальных сообществ, образованных изучаемыми штаммами на хитине или на пластике, клетки холерных вибрионов и кишечной палочки оказались менее восприимчивы к действию антибактериальных препаратов.

Заключение. Повышенная антибиотикоустойчивость биоплёнок холерных вибрионов, образованных на биотических и абиотических поверхностях, подчёркивает опасность их распространения и сохранения в окружающей среде, создаёт дополнительные проблемы в отношении использования антибиотиков и требует разработки альтернативных стратегий снижения резистентности.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, биоплёнка, холерный вибрион

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: Селянская Н.А., Титова С.В., Меньшикова Е.А. Антибиотикочувствительность холерных вибрионов в сложных биоплёнках, сформированных на различных субстратах. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(2):188–195.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-268> EDN: <https://www.elibrary.ru/mpheaf>

Original Study Article
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-268>

Antibiotic sensitivity of cholera vibriions in biofilms formed on various substrates

Nadezhda A. Selyanskaya[✉], Svetlana V. Titova, Elena A. Menshikova

Rostov-on-Don Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russia

Abstract

Introduction. Evaluation of antibiotic sensitivity of biofilms formed by *Vibrio cholerae* can help in the search for effective drugs to combat cholera.

The **aim** of the work is to evaluate the effectiveness of antibacterial drugs against *V. cholerae* cells being a part of a polymicrobial biofilm formed on various substrates.

Materials and methods. Mono- and polymicrobial biofilms were simulated *in vitro* on chitin and plastic in flasks containing tap autoclaved water contaminated with a suspension of 10^4 microbial cells of three strains of *V. cholerae* O1 El Tor separately or in combination with *Escherichia coli* QD 5003.

Results. When being a part of mono- or polymicrobial bacterial communities formed by the studied strains on chitin or plastic, the *V. cholerae* and *E. coli* cells were less susceptible to the action of antibacterial drugs.

Conclusion. The increased antibiotic resistance of *V. cholerae* biofilms formed on biotic and abiotic surfaces highlights the danger of their spread and preservation in the environment, creates additional problems regarding the use of antibiotics and requires the development of alternative strategies to reduce resistance.

Keywords: *antibiotic resistance, biofilm, V. cholerae*

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: Selyanskaya N.A., Titova S.V., Menshikova E.A. Antibiotic sensitivity of cholera vibrios in biofilms formed on various substrates. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2023;100(2):188–195.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-268> EDN: <https://www.elibrary.ru/mpheaf>

Введение

Биоплёнообразование — важная часть жизненного цикла большинства бактерий. Холерные вибрионы могут образовывать биоплёнки на эпителии кишечника человека, что играет решающую роль в патогенезе и передаче инфекции [1]. Биоплёночные агрегаты, сформированные *Vibrio cholerae* в окружающей среде на биотических и абиотических поверхностях, включая хитин зоопланктона, пластик, стекло, обеспечивают сохранение и выживаемость возбудителя между эпидемическими сезонами и резко увеличивают его инфекционность [2–4].

Последние десятилетия были отмечены значительным увеличением наших знаний о структуре, регуляции и функциях биоплёнок, о влиянии условий их формирования на происходящие в них физиологические и молекулярные процессы [5]. Доказано, что микробные сообщества, окружённые внеклеточным матриксом, по сравнению с планктонными клетками более защищены от неблагоприятных воздействий. В то же время степень этой защиты может зависеть от целого ряда факторов, включая поверхность образования и вид бактерий, формирующих биоплёнку [6, 7]. Сложные микробные взаимодействия, происходящие в смешанных поливидовых биоплёнках, наличие конкурентных взаимодействий способны изменять структурные и функциональные характеристики, химический состав биоплёнок, их подверженность дезинфицирующим средствам и антибиотикам [8]. Понимание механизмов развития сложных биоплёнок и их антибиотикочувствительности может помочь в поиске эффективных препаратов для борьбы с биоплёнообразованием.

Цель работы — оценить эффективность антибактериальных препаратов (АБП) в отношении клеток *V. cholerae* в составе полимикробной биоплёнки, образованной на различных субстратах.

Материалы и методы

Для работы из Коллекции патогенных микроорганизмов Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора были получены штаммы: *V. cholerae* O1 El Tor (ctx⁺tcp⁺) №81, 19667, *V. cholerae* O1 El Tor (ctx⁻tcp⁻) № 20000, *Escherichia coli* QD 5003. Моделирование моно- и полимикробных

биоплёнок *in vitro* проводили на фрагментах экзоскелета хитинового панциря широкопалого речного рака *Astacus astacus* либо пластиковых пластинках, которые помещали во флаконы с водопроводной автоклавированной водой (100 мл), контаминированные взвесью 10⁴ микробных клеток каждого штамма или в сочетании *E. coli* с *V. cholerae* 1 : 1, способом, описанным ранее [9, 10]. Флаконы выдерживали 4 сут при 28°C. На 5-е сутки культивирования пластинки хитина или пластика с образовавшимися биоплёнками после трёхкратного промывания в физиологическом растворе переносили в пенициллиновые флаконы, содержащие двукратные разведения АБП в жидкой питательной среде (бульон Хоттингера pH 7,7). В контрольный флакон с биоплёнкой АБП не добавляли. Через 24 ч выращивания в термостате (37°C) делали отпечатки биоплёнок и высеив по 0,1 мл планктонной культуры на пластинки с агаром Хоттингера (pH 7,7). Результат учитывали через 24 ч по наличию или отсутствию роста бактерий. Отнесение культур к чувствительным/устойчивым проводили в соответствии с МУК 4.2.2495-09, МУК 4.2.3745-22 и рекомендациями EUCAST «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Версия 2021–01», определяя минимальные подавляющие концентрации (МПК) препаратов [11–13].

В работе использованы препараты первого (доксикалин, триметоприм/сульфаметоксазол, фуразолидон — отечественного производства, налидиксовая кислота (невиграмон, «CHINOIN Pharmaceutical and Chemical Works Private, Co. Ltd.», Венгрия) и второго ряда (тетрацилин, левомицетин (хлорамфеникол), рифампицин, стрептомицин, ампициллин — отечественного производства), рекомендуемые для определения чувствительности/устойчивости *V. cholerae* [11, 12].

Наличие биоплёнок в полученных образцах подтверждали по визуализации экзополисахаридного матрикса в мазках-отпечатках или непосредственно на пластинках в световом микроскопе («Carl Zeiss Microscopу») с использованием окраски конго красным и фуксином («Интерхим»).

Культуры в мазках-отпечатках биоплёнок идентифицировали по морфологии колоний, тесту

на оксидазу и реакции агглютинации на стекле с О1-холерной сывороткой.

Статистическую обработку результатов определения МПК АБП проводили, вычисляя среднее арифметическое значение (M) результатов трёх повторных опытов, ошибку среднего арифметического значения (m). Различия между значениями МПК планктонных и биоплёночных культур оценивали при помощи критерия Стьюдента при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты

Все исследуемые культуры на 5-е сутки культивирования образовывали биоплёнки, что подтверждает полученные ранее данные о способности *V. cholerae* образовывать моновидовые и сложные биоплёнки на хитине и пластике [14–17].

Все планктонные культуры штаммов *V. cholerae* El Tor проявляли устойчивость к триметоприму/сульфаметоксазолу и фуразолидону. Токсигенные штаммы (ctx^+tcp^+) *V. cholerae* El Tor 19667 и *V. cholerae* El Tor 81 дополнительно были нечувствительны к налидиксовой кислоте. Планктонные клетки *E. coli* были чувствительны ко всем исследуемым АБП (табл. 1).

В составе мономикробных бактериальных сообществ, независимо от субстрата образования, клетки *V. cholerae* и *E. coli* оказались менее восприимчивы к действию АБП, значения МПК которых достоверно увеличились ($p \leq 0,05$) в сравнении со значениями для планктонных культур. До 256 раз возросли значения МПК препаратов, к которым штаммы были резистентны, а величина МПК антибиотиков, сохранявших активность в отношении планктонных культур, достигла показателей устойчивых (табл. 1). При этом уровень антибиотикоустойчивости исследуемых культур в биоплёнках, образованных на хитине и пластике, был одинаков, за исключением устойчивости к тетрациклину и левомицетину штамма *V. cholerae* O1 El Tor 19667, которая достоверно отличалась в 2–8 раз.

Полученные данные согласуются с наблюдениями зарубежных авторов о большей антибиотикоустойчивости штамма *V. cholerae* O139 MO10 (MTCC 3906) в составе биоплёнки в сравнении с его планктонной формой [18].

Антибиотикочувствительность *E. coli* и *V. cholerae* в составе сложных биоплёнок, образованных при их совместном культивировании, достоверно не отличалась от их чувствительности в моновидовых биоплёнках, полученных как на пластике, так и на хитине (табл. 2).

Исключение составил доксициклин, значения МПК которого в отношении штамма *V. cholerae* O1 El Tor 19667 в сложной биоплёнке, образованной на хитине, достоверно превышали (в 2 раза) значе-

ния МПК в сложной биоплёнке, образованной этим штаммом на данном субстрате.

Подсчёт КОЕ методом истошающих мазков-отпечатков показал, что в смешанных биоплёнках преобладали клетки *V. cholerae* (КОЕ было больше на 1–2 порядка). Возможно, это связано с большей скоростью формирования зрелой биоплёнки у *V. cholerae*, чем у *E. coli* [19].

Обсуждение

V. cholerae в составе моно- и полимикробных сообществ, в отличие от планктонных культур, обладали более высокой резистентностью к АБП. Данные литературы свидетельствуют о меньшей чувствительности биоплёнок *V. cholerae*, выращенных на хитине, к воздействию факторов окружающей среды, в частности к действию простейших, в сравнении с биоплёнками, образованными на абиотических поверхностях [20], однако в нашем исследовании повышение антибиотикоустойчивости на хитине показано лишь к тетрациклину и только у одного токсигенного штамма *V. cholerae*. В отношении других исследованных штаммов не выявлено зависимости антибиотикоустойчивости от субстрата, на котором образовалась биоплёнка. Данный факт требует продолжения аналогичных исследований, но, по всей видимости, субстрат не является определяющим в проявлении устойчивости к антибиотикам у бактерий в биоплёночных сообществах, ведь механизмы антибиотикорезистентности в биоплёнках имеют универсальный характер и не зависят от поверхности, на которой они образованы.

Одним из механизмов повышенной устойчивости биоплёнок является трёхмерная структура экзополисахаридного матрикса, ключевыми детерминантами которой служат матричные белки RbmA, RbmC и VarP, регулирующая проникновение различных веществ в биоплёнку [21]. Большинство клеток биоплёнки находятся в стационарном состоянии и представляют собой спящие клетки-персистеры, имеющие фенотип, отличный от планктонных клеток, и являющиеся более устойчивыми к факторам окружающей среды [22]. Экспрессия генов множественной лекарственной устойчивости внутри биоплёнки может приводить к изменению белков внешней мембраны клеток, продукции ферментов, связанных с резистентностью, изменению в деятельности насосов оттока лекарственных препаратов [23]. Другой механизм — это приобретение генов множественной лекарственной устойчивости путём горизонтального переноса, частота которого в биоплёнке выше, чем в планктонном режиме роста [24, 25]. Генетическая адаптация и эволюция, происходящие в биоплёнках, приводят к отбору субпопуляций с большей способностью противостоять текущему и будущему воздействию антибиотиков [26].

Таблица 1. Значения МПК АБП в отношении планктонных и биоплёночных культур, образованных на разных субстратах
Table 1. The values of the MICs of antibacterial drugs against planktonic and biofilm cultures formed on different substrates

АБП Antibacterial drug	Штамм Strain											
	V. cholerae O1 EI Tor 19667			V. cholerae O1 EI Tor 81			V. cholerae O1 EI Tor 20000			E. coli QD 5003		
	ПК PC	БП BP	БХ BC	ПК PC	БП BP	БХ BC	ПК PC	БП BP	БХ BC	ПК PC	БП BP	БХ BC
	средние значения МПК, мг/л (M ± m) average MIC values, mg/liter (M ± m)											
	S	R										
Доксициклин Doxycycline	≤ 2	≥ 4	0,25***	4*	0,25	32*	32*	0,5	16*	16*	0,5	32*
Тетрациклин Tetracycline	≤ 4	≥ 8	0,5	16*	0,5	16*	16*	0,5	32*	32*	0,5	16*
Левомецетин Chloramphenicol	≤ 4	≥ 16	1,3 ± 0,3	128*	4	128*	128*	4	128*	128*	2	256*
Налидиксовая кислота Nalidixic acid	≤ 4	≥ 16	64	2048*	64	1024*	1024*	1	512*	512*	2	1024*
Стрептомицин Streptomycin	≤ 16	≥ 32	16	128*	64	256*	256*	4	32*	32*	8	256*
Ампициллин Ampicillin	≤ 4	≥ 16	4	1024*	4	128*	128*	4	16*	16*	4	256*
Рифампицин Rifampicin	≤ 4	≥ 16	1,3 ± 0,3	32*	4	128*	128*	2	128*	128*	2	128*
Фуразолидон Furazolidone	≤ 4	≥ 16	16	128*	32	512*	512*	16	64*	64*	4	64*
Триметоприм/ сульфаметоксазол Trimethoprim/ sulfamethoxazole	≤ 2/10	≥ 8/40	8/40	2048/10240*	16/80	1024/5120*	1024/5120*	16/80	1024/5120*	1024/5120*	2/10	1024/5120* 1024/5120*

Примечание. Здесь и в табл. 2: S — чувствительный; R — устойчивый; ПК — планктонная культура; БП — биоплёнки, образованные на пластике; БХ — биоплёнки, образованные на хитине.

*Согласно МУК 4.2.2495-09, МУК 4.2.3745-22.

p ≤ 0,05 по сравнению с ПК; *p ≤ 0,05 по сравнению с БП.

Note. Here and in the Table 2: S — sensitive; R — resistant; ПК — plankton cultures on plastic; БП — biofilm cultures on chitin.

#According to Guidelines 4.2.2495-09 and 4.2.3745-22.

*p ≤ 0,05 when compared to ПК; **p ≤ 0,05 when compared to BP.

Таблица 2. Значения МПК АБП в отношении сложных биоплёночных культур, образованных на разных субстратах
Table 2. MICs values of antibacterial drugs against complex biofilm cultures formed on different substrates

АБП Antibacterial drug	Штамм Strain																	
	V. cholerae O1 EI Tor 19667 + E. coli QD 5003			V. cholerae O1 EI Tor 81 + E. coli QD 5003			V. cholerae O1 EI Tor 20000 + E. coli QD 5003			E. coli QD 5003								
	ПК PC	БП BP	БХ BC	ПК PC	БП BP	БХ BC	ПК PC	БП BP	БХ BC	ПК PC	БП BP	БХ BC						
	S	R	средние значения МПК, мг/л (M ± m) average MIC values, mg/liter (M ± m)															
Доксициклин Doxycycline	≤ 2	≥ 4	0,25***	4*	8***	32*	32*	0,25	0,5	16*	16*	0,5	0,5	32*	32*	0,5	32*	32*
Тетрациклин Tetracycline	≤ 4	≥ 8	0,5	16*	128***	16*	16*	0,5	0,5	32*	32*	0,5	0,5	32*	16*	0,5	16*	16*
Левомецетин Chloramphenicol	≤ 4	≥ 16	1,3 ± 0,3	128*	64***	128*	128*	4	4	128*	128*	4	4	128*	256*	2	256*	256*
Налидиксовая кислота Nalidixic acid	≤ 4	≥ 16	64	2048*	2048*	1024*	1024*	64	1	1024*	512*	1	1	512*	1024*	2	1024*	1024*
Стрептомицин Streptomycin	≤ 16	≥ 32	16	128*	256*	256*	64	64	4	32*	32*	4	4	32*	8	8	256*	256*
Ампициллин Ampicillin	≤ 4	≥ 16	4	1024*	1024*	128*	128*	4	4	128*	128*	4	4	16*	4	4	256*	256*
Рифампицин Rifampicin	≤ 4	≥ 16	1,3 ± 0,3	32*	64*	128*	128*	4	2	128*	128*	2	2	128*	2	2	128*	128*
Фуразолидон Furazolidone	≤ 4	≥ 16	16	128*	256*	512*	32	32	16	512*	512*	16	16	64*	4	4	64*	64*
Триметоприм/ сульфаметоксазол Trimethoprim/ sulfamethoxazole	≤ 2/10	≥ 8/40	8/40	2048/10240*	2048/10240*	16/80	1024/5120*	16/80	1024/5120*	1024/5120*	1024/5120*	16/80	1024/5120*	1024/5120*	2/10	1024/5120*	1024/5120*	1024/5120*

Примечание. ***p ≤ 0,05 по сравнению с моновидовой биоплёнкой.
Note. ***p ≤ 0.05 when compared to monospecies biofilm.

В нашем исследовании нарастание устойчивости штаммов *V. cholerae* к стрептомицину, триметоприму/сульфаметоксазолу и налидиксовой кислоте в биоплёночной форме при наличии резистентности к данным АБП у планктонной формы подтверждает наличие в биоплёнках наряду с классическими типами устойчивости, характерными для планктонных форм бактерий, специфических вариантов резистентности, возникающих в биоплёнках.

В полимикробных сообществах межвидовые взаимодействия могут оказывать влияние на устойчивость к антимикробным средствам, наблюдаемую в биоплёнках из одного штамма [8, 27]. Присутствие разных партнёров делает структуру и функцию сообщества более сложными. В механизмы защиты включаются межвидовые сигналы, физиология клеток и генетическая пластичность, связанная со структурным пространственным расположением и архитектурной дифференциацией [28]. Из-за конкурентных взаимодействий биологические характеристики и химический состав моновидовых и полимикробных биоплёнок может сильно различаться [29, 30]. Так, присутствие комменсальной *E. coli* увеличивало образование биоплёнок *V. cholerae* на границе раздела воздух–жидкость *in vitro* и образование многоклеточных скоплений, похожих на биоплёнку, в фекалиях мышей [31]. Таким образом, различные виды бактерий, входящих в состав биоплёнки, могут влиять на её архитектуру и функции. В нашем исследовании в полимикробных биоплёнках, образованных *V. cholerae* совместно с *E. coli*, в сравнении с монобиоплёнками, наблюдалось повышение устойчивости одного токсигенного штамма *V. cholerae* к доксициклину, что свидетельствует о том, что эффективность АБП в составе полимикробных сообществ зависит не только от вида бактерий, образующих биоплёнку, но и имеет индивидуальные штаммовые особенности.

Выводы

1. *V. cholerae* в составе биоплёнок, сформированных на биотических и абиотических поверхностях, обладают повышенной антибиотикоустойчивостью в сравнении с планктонной формой.

2. Различия в антибиотикорезистентности *V. cholerae* в составе моновидовых и сложных биоплёнок в меньшей степени зависят от субстрата образования и в большей степени носят индивидуальный характер, связанный с конкретным штаммом, образующим биоплёнку.

Заключение

Способность *V. cholerae* формировать на биотических и абиотических поверхностях биоплёнки, обладающие повышенной антибиотикоустойчивостью, подчеркивает опасность их распространения и сохранения в окружающей среде, создаёт допол-

нительные проблемы в отношении использования антибиотиков и требует разработки альтернативных стратегий снижения резистентности. При этом следует учитывать наличие межвидовых взаимодействий в сложных сообществах, состоящих из бактерий разных видов, которые могут регулировать устойчивость биоплёнок к воздействию внешних факторов, в том числе АБП, а также штаммовые различия.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Silva A.J., Benitez J.A. *Vibrio cholerae* biofilms and cholera pathogenesis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016;10(2):e0004330. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004330>
2. Laverty A.L., Primpke S., Lorenz C., et al. Bacterial biofilms colonizing plastics in estuarine waters, with an emphasis on *Vibrio* spp. and their antibacterial resistance. *PLoS One.* 2020;15(8):e0237704. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004330>
3. Марков Е.Ю., Куликалова Е.С., Урбанович Л.Я. и др. Хитин и продукты его гидролиза в экологии *Vibrio cholerae*. Обзор. *Биохимия.* 2015;80(9):1334–43. Markov E.Yu., Kulikalova E.S., Urbanovich L.Ya., et al. Chitin and products of its hydrolysis in *Vibrio cholerae* ecology. *Biochemistry (Moscow).* 2015;80(9):1109–16. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0006297915090023> EDN: <https://www.elibrary.ru/uzzknb>
4. Tamayo R., Patimalla B., Camilli A. Growth in a biofilm induces a hyperinfectious phenotype in *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 2010;78(8):3560–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.00048-10>
5. Sun S., Tay Q.X.M., Kjelleberg S., et al. Quorum sensing-regulated chitin metabolism provides grazing resistance to *Vibrio cholerae* biofilms. *ISME J.* 2015;9(8):1812–20. DOI: <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.265>
6. Rao H., Choo S., Mahalingam S.R.R., et al. Approaches for mitigating microbial biofilm-related resistance: a focus on micro- and nanotechnologies. *Molecules.* 2021;26(7):1870. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26071870>
7. Chavez-Doza A., Gorman C., Erken M., Steinberg P.D., McDougald D., Nishiguchi M.K. Predation response of *Vibrio fischeri* biofilms to bacterivorous protists. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013;79(2):553–58. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.02710-12>
8. Chen P., Wang J., Hong B., et al. Characterization of mixed-species biofilm formed by *Vibrio parahaemolyticus* and *Listeria monocytogenes*. *Front. Microbiol.* 2019;10:2543. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02543>
9. Титова С.В., Веркина Л.М. Моделирование биопленок холерных вибрионов на твердых поверхностях (стекле и пластике) и их визуализация в световом и люминесцентном микроскопах. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2016; 61(4):238–41. Titova S.V., Verkina L.M. The modeling of biofilms of comma bacillus on solid surfaces (glass and plastic) and their visualization in light and luminescent microscopes. *Clinical Laboratory Diagnostics.* 2016; 61(4):238–41. DOI: <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2016-61-4-238-241> EDN: <https://www.elibrary.ru/vzgykd>
10. Способ моделирования биоплёнок, формируемых *V. cholerae* O1 серогрупп на поверхности хитина. Патент РФ 2018103604; 2019. A method for modeling biofilms formed by *V. cholerae* O1 serogroup on the chitin surface. Patent RF 2018103604; 2019.
11. Методические указания МУК 4.2.2495–09. Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бру-

- целлѐз, сар, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам. М.; 2009. Methodological guidelines of MUC 4.2.2495–09. Determination of the sensitivity of pathogens of dangerous bacterial infections (plague, anthrax, cholera, tularemia, brucellosis, sар, melioidosis) to antibacterial drugs. Moscow; 2009.
12. Методические указания МУК 4.2.3745-22. Методы лабораторной диагностики холеры. М.; 2022. Methodical instructions of the FLOUR 4.2.3745-22. Methods of laboratory diagnosis of cholera. Moscow; 2022.
 13. EUCAST «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Версия 2021–01». EUCAST «Determination of the sensitivity of microorganisms to antimicrobial drugs. Version 2021–01».
 14. Водопьянов С.О., Веркина Л.М., Водопьянов А.С. и др. Анализ внутривидовой конкуренции в биопленке *Vibrio cholerae* классического и элтор биоваров с помощью Indel-маркеров. В кн.: *Молекулярная диагностика – 2017. Сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием*. М.; 2017;1:300–1. Vodop'yanov S.O., Verkina L.M., Vodop'yanov A.S., et al. Analysis of intraspecific competition in the biofilm of *Vibrio cholerae* of classical and eltor biovars using Indel markers. In: *Molecular Diagnostics – 2017. Proceedings of the IV All-Russian Scientific and Practical Conference with International Participation*. Moscow; 2017;1:300–1.
 15. Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М., Водопьянов С.О. и др. Межродовая конкуренция при формировании сложной биопленки *Vibrio cholerae* и аутохтонной микрофлоры водоемов на хитиновом панцире речного рака. *Бактериология*. 2019;4(1):50–3. Men'shikova E.A., Kurbatova E.M., Vodop'yanov S.O., et al. Intergenous competition in the formation of a complex biofilm of *Vibrio cholerae* and autochthonic microflora of waters on the chitin panzer of crayfish. *Bacteriology*. 2019;4(1):50–3. DOI: <https://doi.org/10.20953/2500-1027-2019-1-50-53> EDN: <https://www.elibrary.ru/rwdhvg>
 16. Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М., Водопьянов С.О. и др. Оценка способности холерных вибрионов формировать биопленку на поверхности хитинового панциря речного рака. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(4):434–9. Men'shikova E.A., Kurbatova E.M., Vodop'yanov S.O., et al. Evaluation of the ability of cholera vibrios to form a biofilm on the surface of the chitinous shell of a crayfish by real-time PCR. *Journal of Microbiology Epidemiology and Immunobiology*. 2021;98(4):434–9. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-99> EDN: <https://www.elibrary.ru/rvujzp>
 17. Lutz C., Erken M., Noorian P., et al. Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae*. *Front. Microbiol.* 2013;4:375. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00375>
 18. Gupta P., Mankere B., Keloth S.C., et al. Increased antibiotic resistance exhibited by the biofilm of *Vibrio cholerae* O139. *J. Antimicrob. Chemother.* 2018;73(7):1841–7. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dky127>
 19. Abriat C., Enriquez K., Virgilio N., et al. Mechanical and microstructural insights of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* dual-species biofilm at the air-liquid interface. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 2020;188:110786. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110786>
 20. Chavez-Dozal A., Gorman C., Erken M., et al. Predation response of *Vibrio fischeri* biofilms to bacterivorous protists. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013;79(2):553–8. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.02710-12>
 21. Giacomucci S., Cros C.D., Perron X., et al. Flagella-dependent inhibition of biofilm formation by sub-inhibitory concentration of polymyxin B in *Vibrio cholerae*. *PLoS One*. 2019;14(8):e0221431. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221431>
 22. Zhang K., Li X., Yu C., Wang Y. Promising therapeutic strategies against microbial biofilm challenges. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020;10:359. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00359>
 23. Kean R., Delaney C., Sherry L., et al. Transcriptome assembly and profiling of *Candida auris* reveals novel insights into biofilm-mediated resistance. *mSphere*. 2018;3(4):00334-18. DOI: <https://doi.org/10.1128/mSphere.00334-18>
 24. Laverty A.L., Primpke S., Lorenz C., et al. Bacterial biofilms colonizing plastics in estuarine waters, with an emphasis on *Vibrio* spp. and their antibacterial resistance. *PLoS One*. 2020;5(8):e0237704. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237704>
 25. Viroille C., Goldlust K., Djermoun S., et al. Plasmid transfer by conjugation in gram-negative bacteria: from the cellular to the community level. *Genes (Basel)*. 2020;11(11):1239. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes11111239>
 26. Penesyan A., Paulsen I.T., Gillings M.R., et al. Secondary effects of antibiotics on microbial biofilms. *Front. Microbiol.* 2020;11:2109. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02109>
 27. Sanchez-Vizuetе P., Orgaz B., Aymerich S., et al. Pathogens protection against the action of disinfectants in multispecies biofilms. *Front. Microbiol.* 2015;6:705. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00705>
 28. Giaouris E., Heir E., Desvaux M., et al. Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* 2015;6:841. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00841>
 29. Liu W. Z., Russel J., Burmolle M., et al. Micro-scale intermixing: a requisite for stable and synergistic co-establishment in a four-species biofilm. *ISME J.* 2018;12(8):1940–51. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0112-2>
 30. Ramirez-Mora T., Retana-Lobo C., Valle-Bourrouet G. Biochemical characterization of extracellular polymeric substances from endodontic biofilms. *PLoS One*. 2018;13(11):e0204081. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204081>
 31. Wang H., Li F., Xu L., et al. Contributions of *Escherichia coli* and its motility to the formation of dual-species biofilms with *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2021;87(18):e0093821. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.00938-21>

Информация об авторах

Селянская Надежда Александровна[✉] — к.м.н., с.н.с. отдела микробиологии холеры и других острых кишечных инфекций Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия, ppdn@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0008-4705>

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

Меньшикова Елена Аркадьевна — к.б.н., с.н.с. отдела микробиологии холеры и других острых кишечных инфекций Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6003-4283>

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 20.12.2022;
принята к публикации 15.02.2023;
опубликована 28.04.2023

Information about the authors

Nadezhda A. Selyanskaya[✉] — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Department of microbiology of cholera and other acute intestinal infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russia, ppdn@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0008-4705>

Svetlana V. Titova — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Department of natural focal infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7831-841X>

Elena A. Menshikova — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Department of microbiology of cholera and other acute intestinal infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6003-4283>

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 20.12.2022;
accepted for publication 15.02.2023;
published 28.04.2023

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-281>



Гуморальный иммунитет к коклюшу у медицинских работников

Самодова О.В., Кригер Е.А.[✉], Рогушина Н.Л., Звездина Ю.М., Шагров Л.Л.

Северный государственный медицинский университет, Архангельск, Россия

Аннотация

Введение. Вакцинация является самым эффективным способом профилактики инфекционных заболеваний. Недостаточный охват вакцинацией медицинских работников — серьезная проблема всех учреждений здравоохранения. Отсутствие специфической защиты против коклюша обуславливает риск заболевания медицинских работников, в случае которого они становятся источником инфекции для пациентов. Коклюш — одна из наиболее актуальных вакциноконтролируемых инфекций, до настоящего времени остается проблемой общественного здравоохранения во многих странах, несмотря на высокий охват вакцинацией детей. Ревакцинация взрослых против коклюша не включена в Национальный календарь профилактических прививок Российской Федерации.

Цель работы — оценка гуморального иммунитета к коклюшу у медицинских работников инфекционных стационаров.

Материалы и методы. Проведено поперечное исследование с участием 252 медицинских работников. Участники исследования прошли опрос и были обследованы на антитела (иммуноглобулины G) к *Bordetella pertussis* методом иммуноферментного анализа.

Результаты. Доля медицинских работников, серонегативных к коклюшу, составила 46,8%, медицинских работников с неизвестным вакцинальным статусом — 40,5%. Более половины (55,6%) участников исследования были вакцинированы, 3,9% переболели коклюшем в детстве. Недавняя инфекция была установлена у 8,0% участников, имевших уровень антител к *Bordetella pertussis* выше 50 СвЕд/мл. Доля серонегативных к коклюшу (55,2%) была выше в возрастной группе моложе 30 лет в сравнении с другими возрастными группами. Медиана концентрации противокклюшных антител у серопозитивных медицинских работников — 28,3 СвЕд/мл.

Заключение. Наличие значительной доли серонегативных (46,8%) и перенёсших острую инфекцию подтверждает необходимость оптимизации специфической профилактики коклюша, в том числе иммунизации групп риска, к которым относятся медицинские работники, с целью снижения рисков возникновения инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи.

Ключевые слова: вакцинация, гуморальный иммунитет, серопревалентность, медицинские работники, коклюш

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен комитетом по этике Северного государственного медицинского университета (протокол № 01/04-22 от 29.04.2022).

Источник финансирования. Внутривузовский грант ФГБОУ ВО СГМУ МЗ России по итогам конкурса на лучшие проекты молодых учёных по приоритетным направлениям инновационного развития СГМУ (приказ ректора № 9 от 26.01.2021).

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

Для цитирования: Самодова О.В., Кригер Е.А., Рогушина Н.Л., Звездина Ю.М., Шагров Л.Л. Гуморальный иммунитет к коклюшу у медицинских работников. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(2):196–202.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-281> EDN: <https://www.elibrary.ru/nxtsds>

Original Study Article
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-281>

Humoral immunity against pertussis among healthcare workers

Olga V. Samodova, Ekaterina A. Krieger[✉], Natal'ya L. Rogushina, Uliya M. Zvezdina, Leonid L. Shagrov

Northern State Medical University, Arkhangelsk, Russia

Abstract

Background. Vaccination is the most effective way to prevent infectious diseases. Inadequate vaccination coverage among healthcare workers is a major concern for healthcare organizations. The lack of specific immunity against pertussis represents the risk for acquiring a healthcare associated infection by medical staff but also of being a source of infection to patients. More than 70% of all healthcare associated infections are vaccine-preventable. Pertussis remains one of the most important vaccine-preventable infections and continues to be a public health concern even in countries with high vaccination coverage among children. Revaccination of adults against pertussis is not included in the National vaccination schedule of the Russian Federation.

Aim. To assess the humoral immunity against pertussis among healthcare workers of the infectious disease hospitals.

Materials and methods. We conducted a cross-sectional study that included 252 healthcare workers. All study participants were surveyed and tested for antibodies (immunoglobulins G) against *Bordetella pertussis* by enzyme immunoassay.

Results. The proportion of healthcare workers seronegative for pertussis was 46.8%. The healthcare workers with unknown vaccination status amounted to 40.5%. More than half (55.6%) of the participants have been vaccinated and 3.9% of them have had pertussis in childhood. A recent infection was confirmed in 8.0% of participants who had the level of antibodies to *Bordetella pertussis* greater than 50 U/ml. The largest proportion of participants seronegative to *Bordetella pertussis* (55.2%) was observed among those under 30 years. The median level of antibodies against pertussis in seropositive health workers was 28.3 U/ml.

Conclusion. The significant proportion of seronegative participants (46.8%) and those who had the recent infection underline the necessity of the improvement of pertussis prevention by implementation of vaccination in the risk groups, including healthcare workers to reduce the risk of healthcare associated infections.

Keywords: vaccination, humoral immunity, seroprevalence, healthcare workers, pertussis

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Northern State Medical University (protocol No. 01/04-22, April 29, 2022).

Funding source. Intra-university grant of the Northern State Medical University following the results of the competition for the best projects of young scientists in priority areas of innovative development of the SSMU (Order of the Rector No. 9, January 26, 2021).

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

For citation: Samodova O.V., Krieger E.A., Rogushina N.L., Zvezdina U.M., Shagrov L.L. Humoral immunity against pertussis among healthcare workers. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2023;100(2):196–202.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-281> EDN: <https://www.elibrary.ru/nxtsds>

Введение

Вакцинация является самым эффективным средством профилактики инфекционных заболеваний. Однако сомнения в отношении вакцинации или феномен, обозначаемый в литературе как «vaccine hesitancy» (нерешительность в отношении прививок), — явление, в настоящее время широко распространённое не только среди населения, но и среди медицинских работников (МР), которые в процессе профессиональной деятельности имеют повышенный риск инфицирования различными патогенами. По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), примерно 59 млн МР по всему миру ежедневно контактируют с опасными биологическими агентами, и, несмотря на это, в целом охват вакцинацией МР очень низок [1].

Недостаточный охват вакцинацией МР является серьёзной проблемой всех учреждений здравоохранения, поскольку отсутствие специфической защиты у МР, с одной стороны, создаёт риск их заражения управляемыми инфекциями в процессе профессиональной деятельности, с другой — риск заболевания пациентов, для которых персонал медицинской организации становится источником ин-

фекций, связанных с оказанием медицинской помощи, более 70% из которых (грипп, корь, вирусные гепатиты, коклюш) являются вакциноконтролируемыми, т.е. предотвратимыми [1, 2].

Одной из актуальных вакциноконтролируемых инфекций, а также инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, может быть коклюш, вспышки которого часто регистрируются в отделениях неонатального профиля и родильных домах. Диагностика вспышки коклюша среди сотрудников родильного дома в Хэмпшире (Великобритания) была затруднена из-за сезонного подъёма респираторных инфекций верхних дыхательных путей. Наибольшему риску были подвержены женщины со сроком беременности более 32 нед, которые не были привиты от коклюша во время беременности, и МР, не получавшие прививку от коклюша в течение предыдущих 5 лет [3].

Новорождённые и дети раннего возраста, госпитализированные в отделения интенсивной терапии новорождённых, составляют группу наиболее восприимчивых пациентов, учитывая неадекватный иммунный ответ и отсутствие вакцинации. Наибольшему риску коклюша, связанному с оказанием

медицинской помощи, подвержены недоношенные дети в связи с отсутствием или низким уровнем материнских антител. В этой группе коклюш характеризуется высокой летальностью, тяжестью течения и развитием осложнений в виде пневмонии, апноэ, судорог и энцефалопатии [4]. Вспышки нозокомиального коклюша описаны и среди взрослых пациентов, преимущественно иммунокомпрометированных [5], а также среди персонала хирургического госпиталя [6].

Коклюш остаётся проблемой общественно-го здравоохранения во многих странах, несмотря на высокий охват вакцинацией детей. В России не регламентирована ревакцинация взрослых против коклюша, поэтому, учитывая непродолжительность поствакцинального противокклюшного иммунитета, формируется значительная когорта взрослых, восприимчивых к этой инфекции, что способствует поддержанию эпидемического процесса и инфицированию детей раннего возраста, не защищённых от коклюша [7]. Кроме того, у взрослых, в отличие от детей раннего возраста и подростков, длительность сохранения кашля после острого периода может достигать 100 дней, что значительно увеличивает период нетрудоспособности и требует длительной реабилитации [8].

Одной из задач Стратегии развития иммунопрофилактики инфекционных болезней на период до 2035 г., утверждённой распоряжением Правительства РФ № 2390-р от 18.09.2020, является разработка программ вакцинации профессиональных групп, в том числе МР. С учётом этой задачи в условиях продолжающейся пандемии новой коронавирусной инфекции целесообразна оценка серопревалентности МР к вакциноконтролируемым заболеваниям, отчасти ещё и потому, что МР не в полной мере оценивают личный риск, связанный с их профессиональной деятельностью [9]. Исследования, посвящённые изучению гуморального иммунитета к коклюшной инфекции у МР, немногочисленны [10–12]. Исходя из этого, изучение серопревалентности коклюша у МР является актуальным.

Цель исследования: оценка гуморального иммунитета к коклюшу у МР инфекционных стационаров.

Материалы и методы

Проведено поперечное исследование с участием 252 МР инфекционных отделений Архангельской области (Архангельска, Северодвинска и Новодвинска) — сплошная выборка. Исследование включало опрос и забор венозной крови для определения уровня иммуноглобулинов класса G (IgG) к *Bordetella pertussis*. Анкета включала вопросы, касающиеся социодемографических (пол, возраст) и профессиональных характеристик участников (должность, стаж работы), а также сведений о по-

лученных профилактических прививках (прививочный сертификат) и перенесённых заболеваниях.

Лабораторные исследования проводились на базе центральной научной лаборатории Северного государственного медицинского университета. Гуморальный иммунитет к *B. pertussis* оценивали методом иммуноферментного анализа (ИФА), эффективность которого для верификации коклюша доказана многочисленными исследованиями. Установлено, что из всех имеющихся в настоящее время очищенных антигенных препаратов коклюшной бактерии предпочтение должно отдаваться коклюшному токсину и филаментозному гемагглютинину [13]. Отсутствие отечественных тест-систем ограничивает применение ИФА для серологической диагностики коклюша в России, поэтому исследование выполнено с использованием доступной зарубежной тест-системы «SeroPertussis IgG Savyon Diagnostics Ltd.», которая предназначена для полуколичественного определения специфических IgG антител к *B. pertussis* методом ИФА. Повышенные уровни антител к токсину *Pertussis* и волокнам гемагглютинина являются чувствительными серологическими маркерами для диагностики коклюша у взрослых и невакцинированных детей.

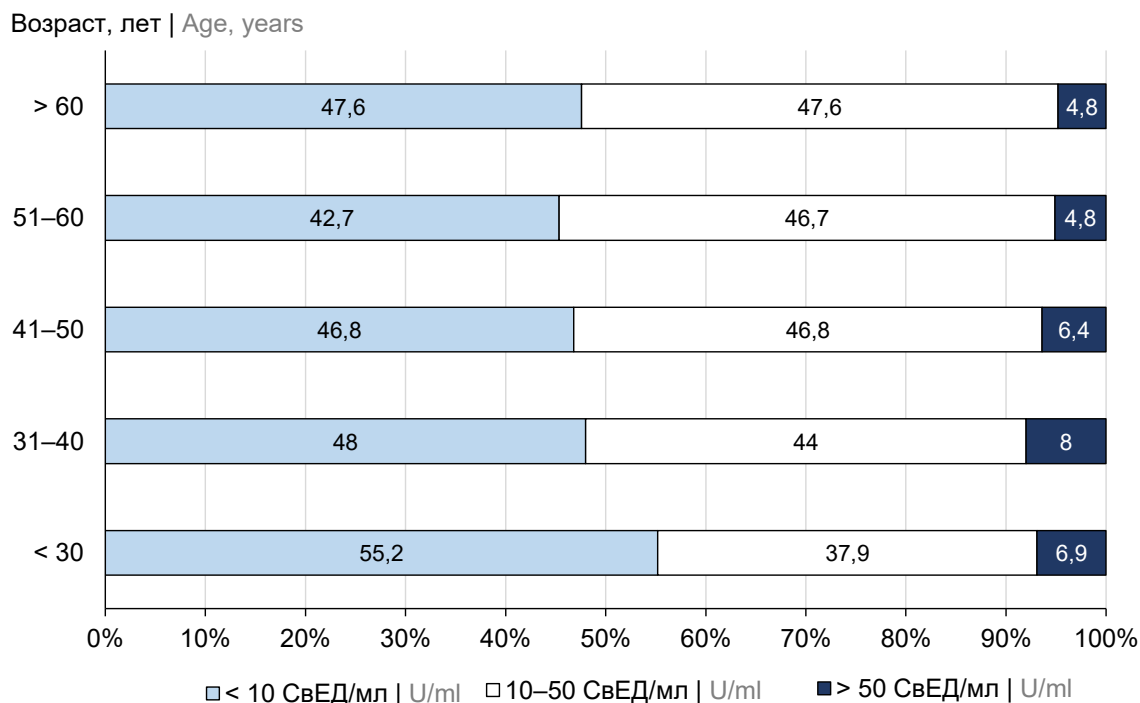
Согласно инструкции производителя к тест-системам, результат в диапазоне от 10 до 50 условных связавшихся единиц специфических IgG к *B. pertussis* в миллилитре (СвЕд/мл) расценивается как положительный, при концентрации IgG < 10 СвЕд/мл — как отрицательный. Уровень IgG > 50 СвЕд/мл указывает на недавно перенесённую инфекцию.

Результаты исследования представлены с указанием частот и долей для качественных данных, а также медианы, первого и третьего квартилей — для количественных данных. Для сравнения частот и долей использовали тест χ^2 Пирсона. Сравнение средних в 2 и 3 группах с непараметрическим распределением данных проводилось с использованием теста Манна–Уитни и критерия Краскела–Уоллиса соответственно.

Результаты

Среди участников исследования преобладали женщины (94,8%). Медицинские сёстры составили 63,1%, врачи — 32,1%, вспомогательный персонал — 4,8%. Возраст участников варьировал от 21 до 81 года, медиана — 47 (38; 55) лет. Более 60% составляли МР в возрасте 40–60 лет. Стаж работы в отделениях инфекционного профиля для 65,1% МР превышал 10 лет.

Доля МР, не имевших антител к коклюшу, составила 46,8%. У 45,2% IgG определялись в количестве 10–50 СвЕд/мл, что подтверждает наличие поствакцинального или постинфекционного иммунитета. У 20 (8,0%) МР уровень антител к *B. pertussis*



Концентрация специфических антител (IgG) к *Bordetella pertussis* у МР разных возрастных групп.
Concentration of specific antibodies (IgG) to *Bordetella pertussis* in different age groups of healthcare workers.

превышал 50 СвЕд/мл, что свидетельствует о недавно перенесённой инфекции. Большинство (70%) МР, недавно переболевших коклюшем, работали со взрослыми пациентами, и только 30% — с детьми. Стаж работы в инфекционных отделениях у 70% перенесших коклюш МР — более 10 лет.

Концентрация противокклюшных антител у серопозитивных МР варьировала от 10 до 75 СвЕд/мл, медиана составила 28,3 (16,7; 42,5) СвЕд/мл.

Высокий процент серонегативных лиц (55,2%) наблюдался среди МР моложе 30 лет, в более старших возрастных группах доля МР, не имеющих антител, варьировала от 42,7 до 48,0% (рисунк). Медианы концентрации антител не различались в зависимости от занимаемой должности ($p = 0,87$) и стажа работы ($p = 0,89$).

Вакцинальный статус 40,5% МР был неизвестен, 55,6% сообщили, что были вакцинированы адсорбированной коклюшно-дифтерийно-столбнячной вакциной в детском возрасте, 3,9% болели коклюшем ранее. МР старше 50 лет (52,1%) чаще не указывали вакцинального статуса в отношении коклюша в сравнении с более молодыми ($\chi^2 = 14,0$; $p < 0,01$). Средний (42,2%) и младший медицинский персонал (66,6%) чаще не знал своего вакцинального статуса по сравнению с врачами (33,3%; $\chi^2 = 12,9$; $p = 0,01$). Никто из обследованных МР не был вакцинирован/ревакцинирован против коклюша во взрослом возрасте.

У переболевших коклюшем, включая тех, кто болел в детстве, медиана концентрации антител

была выше — 38,2 (24,9; 75,0) СвЕд/мл, чем у тех, кто привит в детском возрасте, — 30,4 (16,9; 45,9) СвЕд/мл; $p = 0,03$.

Обсуждение

МР — группа высокого риска возникновения и распространения вакциноконтролируемых инфекций [1, 14]. Во многих странах разработаны программы вакцинации медицинских работников, существуют нормативные документы, регламентирующие вакцинацию этой группы риска, хотя в целом охват прививками МР далёк от оптимального [15]. В России целевые программы вакцинации или системные рекомендации по вакцинации МР отсутствуют. Большинство российских научных исследований посвящены оценке специфического иммунитета МР к кори [16], гриппу, гепатиту В, новой коронавирусной инфекции [17, 18]. Проведённое исследование позволило оценить специфический иммунитет МР инфекционных стационаров, среди которых доля незащищённых от коклюша составила 46,8%.

В течение последних десятилетий отмечен рост заболеваемости коклюшем в мире, несмотря на высокий охват вакцинацией детей. С целью уменьшения бремени инфекции, учитывая, что взрослые могут быть источником инфекции для детей, предложены несколько стратегий вакцинации взрослых против коклюша: вакцинация беременных, стратегия кокона и вакцинация МР. В 9 странах вакцинация МР от коклюша рекомендована на национальном уровне [7]. В США, Канаде, Австралии, Нидер-

ландах, Германии и Великобритании вакцинации против коклюша подлежат все МР. Но особенно важна защита от коклюша сотрудников неонатальных, акушерских, педиатрических отделений, которых вакцинируют в Австрии, Финляндии, Норвегии и Бразилии [9]. По данным систематического обзора В.А. Randi и соавт., охват вакцинацией контролируется в США и Франции; в США он составил 6,1% в 2007 г. и повысился до 45,1% в 2015 г., во Франции был максимальным — 63,9% [9]. Доля серопозитивных в отношении *B. pertussis* МР в разных странах варьирует: 11,4% в Тунисе, 29,4% в Италии [9], 37,0% в Корею [11], 60,4% в Турции [12]. В нашем исследовании доля защищённых от коклюша, несмотря на отсутствие регламентированной в России вакцинации взрослых, составила 53,2% и была сопоставима в данными, представленными в описательном обзоре R. Squeri и соавт., — 40,0–63,9% [14].

Наличие значительной доли серонегативных участников проведённого исследования (46,8%) в условиях пандемии COVID-19 создаёт определённые риски возникновения вспышек коклюша в инфекционных отделениях стационаров [4], где пациенты с COVID-19 представляют достаточно уязвимую группу. В исследовании, проведённом в Китае, установлено, что у пациентов с COVID-19-пневмонией частота выделения *B. pertussis* составила 10,3%, что значительно выше, чем у пациентов с пневмонией и отрицательным результатом обследования на наличие SARS-CoV-2 — 4,25% ($\chi^2 = 5,6$; $p = 0,02$) [19]. Спастический приступообразный кашель, обусловленный *B. pertussis*, способствует распространению аэрогенным путём не только возбудителя коклюша, но и коронавируса, подавляет функцию иммунной системы и вызывает респираторные нарушения.

У 8,0% обследованных нами МР уровень антител к *B. pertussis* был высоким (> 50 СвЕд/мл), что указывает на недавнюю инфекцию, которая, вероятно, протекала в лёгкой или субклинической форме, что наиболее характерно для взрослых, т.к. на факт перенесённого коклюша никто из респондентов не указал [20]. Результаты исследования, проведённого в Университетском педиатрическом госпитале Турции, выявили значительно больший удельный вес МР с недавно перенесённым коклюшем — 21,3%, что может быть связано с профилем стационара [12]. В исследовании корейских учёных доля МР с острой инфекцией составила 0,8% [11].

Большая часть серонегативных (55,2%) к коклюшу МР в нашем исследовании была выявлена в возрастной группе до 30 лет, что можно объяснить утратой поствакцинального иммунитета, а увеличение доли серопозитивных в группе старше 50 лет (56,3%) — наличием скрытой циркуляции *B. pertussis*, что способствует замене поствакцинального иммунитета на постинфекционный,

уменьшению доли восприимчивых МР, но увеличивает риск коклюша, связанного с оказанием медицинской помощи, для госпитализированных пациентов [21].

Ни вакцинация, ни перенесённая инфекция не формируют пожизненного иммунитета к коклюшу, тем не менее исследователи отмечают меньшую продолжительность поствакцинального иммунитета в сравнении с постинфекционным, что согласуется с полученными результатами, медиана концентрации антител была выше у болевших коклюшем в сравнении с привитыми ($p = 0,03$) [22].

Заключение

Проведённое исследование позволило оценить гуморальный иммунитет к коклюшу у МР инфекционных стационаров. Доля серопозитивных в отношении коклюша МР не превышала 53,2%. Концентрация противокклюшных антител среди серопозитивных варьировала 10 до 75 СвЕд/мл, медиана концентрации специфических антител у МР составила — 28,3 (16,7; 42,5) СвЕд/мл. У 8,0% обследованных уровень антител к возбудителю коклюша был более 50 СвЕд/мл, что свидетельствует об острой невыявленной инфекции. Наличие значительной доли серонегативных (46,8%) и перенёвших острую инфекцию подтверждает необходимость оптимизации специфической профилактики коклюша, в том числе иммунизации групп риска, к которым относятся МР, с целью снижения рисков возникновения инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Genovese C., Picerno I.A.M., Trimarchi G., Cannavò G., Egitto G., Cosenza B., et al. Vaccination coverage in healthcare workers: a multicenter cross-sectional study in Italy. *J. Prev. Med. Hyg.* 2019;60(1):12–7. DOI: <https://doi.org/10.15167/2421-4248/jpmh2019.60.1.1097>
2. Сергеева И.В., Тихонова Е.П., Андропова Н.В. и др. Заболеваемость медицинских работников инфекционными болезнями, связано ли это с профессиональной деятельностью. *Современные проблемы науки и образования.* 2015;(6):24. Sergeeva I.V., Tikhonova E.P., Andronova N.V., et al. Morbidity medical workers infectious diseases, whether it is connected with the professional activity. *Modern Problems of Science and Education.* 2015;(6):24. EDN: <https://www.elibrary.ru/vjppvd>
3. Petridou C., Gray H., Heard M., et al. Outbreak of pertussis among healthcare workers in a hospital maternity unit. *J. Infect. Prev.* 2017;18(5):253–5. DOI: <https://doi.org/10.1177/1757177417693678>.
4. Maltezou H.C., Ftika L., Theodoridou M. Nosocomial pertussis in neonatal units. *J. Hosp. Infect.* 2013;85(4):243–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2013.09.009>
5. Bassinet L., Matrat M., Njamkepo E., et al. Nosocomial pertussis outbreak among adult patients and healthcare workers. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 2004;25(11):995–7. DOI: <https://doi.org/10.1086/502332>
6. Pascual F.B., McCall C.L., McMurtray A., et al. Outbreak of pertussis among healthcare workers in a hospital surgical unit. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2006;27(6):546–52. DOI: <https://doi.org/10.1086/506232>

7. Брико Н.И., Фельдблюм И.В., Субботина К.А. и др. Вакцинопрофилактика инфекционных заболеваний у взрослых. *Журнал инфектологии*. 2018;10(2):5–16. Briko N.I., Fel'dblyum I.V., Subbotina K.A., et al. Vaccinal prevention of infectious diseases in adults. *Journal Infectology*. 2018;10(2):5–16. DOI: <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2018-10-2-5-16> EDN: <https://www.elibrary.ru/xpvcsp>
8. Ломоносова А.В. *Эпидемиологические особенности и основные направления надзора и профилактики коклюша на современном этапе*: Дисс. ... канд. мед. наук. М.; 2021. Lomonosova A.V. *Epidemiological features and main directions of supervision and prevention of whooping cough at the present stage*: Diss. Moscow; 2021.
9. Randi B.A., Sejas O.N.E., Miyaji K.T., et al. A systematic review of adult tetanus-diphtheria-acellular (Tdap) coverage among healthcare workers. *Vaccine*. 2019;37(8):1030–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.12.046>
10. Rodríguez de la Pinta M.L., Castro Lareo M.I., Ramon Torrell J.M., et al. Seroprevalence of pertussis amongst healthcare professionals in Spain. *Vaccine*. 2016;34(8):1109–14. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.12.036>
11. Choi W.S., Kim S.H., Park D.W. Seroprevalence of pertussis in healthcare workers without adult pertussis vaccine use at a university hospital in Korea. *J. Korean Med. Sci.* 2018;33(50):e321. DOI: <https://doi.org/10.3346/jkms.2018.33.e321>
12. Özer S., Oğuz V.A. Pediatric hospital healthcare workers and pertussis; a seroprevalence study. *Turk. J. Pediatr.* 2021;63(3):355–62. DOI: <https://doi.org/10.24953/turkjped.2021.03.002>
13. Попова О.П., Скирда Т.А., Федорова И.М. и др. Диагностическая ценность метода ИФА при коклюше у детей. *Детские инфекции*. 2016;15(2):36–40. Popova O.P., Skirda T.A., Fyodorova I.M., et al. The diagnostic value of ELISA method for pertussis in children. *Children Infections*. 2016;15(2):36–40. DOI: <https://doi.org/10.22627/2072-8107-2016-15-2-36-40> EDN: <https://www.elibrary.ru/vzwdxp>
14. Squeri R., Di Pietro A., La Fauci V., Genovese C. Healthcare workers' vaccination at European and Italian level: a narrative review. *Acta Biomed.* 2019;90(9-S):45–53. DOI: <https://doi.org/10.23750/abm.v90i9-S.8703>
15. Maltezou H.C., Theodoridou K., Ledda C., et al. Vaccination of healthcare workers: is mandatory vaccination needed? *Expert Rev. Vaccines*. 2019;18(1):5–13. DOI: <https://doi.org/10.1080/14760584.2019.1552141>
16. Ткаченко Т.Г., Дмитриев А.В., Гудков Р.А., Федина Н.В. Оценка состояния противокорревого иммунитета у сотрудников детской больницы. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2021; 20(4):73–8. Tkachenko T.G., Dmitriev A.V., Gudkov R.A., Fedina N.V. Assessment of the state of anti-measles immunity in medicine personnel of a children's hospital. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2021;20(4):73–8. DOI: <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-4-73-78> EDN: <https://www.elibrary.ru/tixtktx>
17. Агафонова Е.В., Куликов С.Н., Решетникова И.Д. и др. Результаты исследования серопревалентности к SARS-CoV-2 у медицинских работников: возрастные и профессиональные аспекты. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2021;20(2):49–57. Agafonova E.V., Kulikov S.N., Reshetnikova I.D., et al. Seroprevalence study results to SARS-CoV-2 in healthcare workers: age and professional aspects. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2021;20(2):49–57. DOI: <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-2-49-57> EDN: <https://www.elibrary.ru/hkllini>
18. Решетникова И.Д., Тюрин Ю.А., Агафонова Е.В. и др. Изучение особенностей гуморального иммунного ответа к новой коронавирусной инфекции COVID-19 среди медицинских работников. *Инфекция и иммунитет*. 2021;11(5):934–42. Reshetnikova I.D., Tyurin Y.A., Agafonova E.V., et al. Study of features of humoral immune response to the new coronavirus infection COVID-19 among healthcare workers. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2021;11(5):934–42. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-SOT-1587> EDN: <https://www.elibrary.ru/iuugmk>
19. He F., Xia X., Nie D., et al. Respiratory bacterial pathogen spectrum among COVID-19 infected and non-COVID-19 virus infected pneumonia patients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2020;98(4):115199. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.115199>
20. Пименова А.С., Борисова О.Ю., Цвиркун О.В. и др. Эффективность применения молекулярно-генетической диагностики при обследовании очагов коклюшной инфекции. *Инфекция и иммунитет*. 2017;7(2):162–70. Pimenova A.S., Borisova O.Y., Tsvircun O.V., et al. Effectiveness of molecular-genetic diagnostics during pertussis infection foci examination. *Journal of Infection and Immunity*. 2017;7(2):162–70. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2017-2-162-170> EDN: <https://www.elibrary.ru/yskftfn>
21. Басов А.А., Цвиркун О.В., Герасимова А.Г. и др. Состояние специфического иммунитета к коклюшу в разных возрастных группах детей. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2015;14(3):84–8. Basov A.A., Tsvirkun O.V., Gerasimova A.G., et al. Condition of specific immunity to pertussis in different age groups of children. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2015;14(3):84–8. DOI: <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2015-14-3-84-88> EDN: <https://www.elibrary.ru/ucebmf>
22. Иозефович О.В. *Коклюшная инфекция у ранее привитых, сравнительная эффективность и безопасность цельноклеточной и бесклеточной коклюшных вакцин*: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. СПб.; 2020. Iozefovich O.V. *Pertussis infection in previously vaccinated, comparative efficacy and safety of whole-cell and cell-free pertussis vaccines*: Diss. St. Petersburg; 2020.

Информация об авторах

Самодова Ольга Викторовна — д.м.н., профессор, зав. каф. инфекционных болезней Северного государственного медицинского университета, Архангельск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6730-6843>

Кригер Екатерина Анатольевна[✉] — к.м.н., доцент каф. инфекционных болезней Северного государственного медицинского университета, Архангельск, Россия, kate-krieger@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5179-5737>

Рогушина Наталья Леонидовна — к.м.н., доцент каф. инфекционных болезней Северного государственного медицинского университета, Архангельск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0848-7461>

Звездина Юлия Михайловна — м.н.с. центра коллективного пользования лабораторным оборудованием центральной на-

Information about the authors

Olga V. Samodova — D. Sci. (Med.), Head, Department of infectious diseases, Northern State Medical University, Arkhangelsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6730-6843>

Ekaterina A. Krieger[✉] — Cand. Sci. (Med.), associate professor, Department of infectious diseases, Northern State Medical University, Arkhangelsk, Russia, kate-krieger@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5179-5737>

Natal'ya L. Rogushina — Cand. Sci. (Med.), associate professor, Department of infectious diseases, Northern State Medical University, Arkhangelsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0848-7461>

Yulia M. Zvezdina — junior researcher, Central research laboratory, Northern State Medical University, Arkhangelsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5725-0145>

учно-исследовательской лаборатории Северного государственного медицинского университета, Архангельск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5725-0145>

Шагров Леонид Леонидович — м.н.с. центра коллективного пользования лабораторным оборудованием центральной научно-исследовательской лаборатории Северного государственного медицинского университета, Архангельск, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2655-9649>

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 02.12.2022;
принята к публикации 07.02.2023;
опубликована 28.04.2023

Leonid L. Shagrov — junior researcher, Central research laboratory, Northern State Medical University, Arkhangelsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2655-9649>

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 02.12.2022;
accepted for publication 07.02.2023;
published 28.04.2023



Антигенная идентичность иммунодоминантных белков геновариантов *Bacillus anthracis*

Ижбердеева М.П.[✉], Сауткина А.А., Баркова И.А., **Викторов Д.В.**

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Волгоград, Россия

Аннотация

Введение. Основным биологическим сырьём при производстве иммунобиологических препаратов для индикации и идентификации *Bacillus anthracis* являются специфические антигены — протективный антиген (ПА) и белок EA1.

Цель работы — определить антигенную идентичность иммунодоминантных белков, выделенных гель-хроматографией и электрофорезом, различных геновариантов *B. anthracis*.

Материалы и методы. В работе использованы культуральные фильтраты изогенных вариантов штамма *B. anthracis* 575/122 (pXO1⁺, pXO2⁺): R01 (pXO1⁺, pXO2⁻); R00 (pXO1⁻, pXO2⁻). Гель-хроматографическое фракционирование и электрофоретическое разделение проведено по стандартным методикам. Антигенные свойства белков, выделенных гель-хроматографией и электрофорезом, изучены в реакции иммунодиффузии с поликлональными моноспецифическими сыворотками к ПА и белку EA1 S-слоя.

Результаты. При гель-хроматографическом разделении культуральных фильтратов *B. anthracis* 575/122: R01 (pXO1⁺, pXO2⁻) и R00 (pXO1⁻, pXO2⁻) получены фракция 1 и фракция 5. Сыворотки к белку EA1, а также к фракции 1 культуральных фильтратов штаммов *B. anthracis* 575/122 R00 и *B. anthracis* 575/122 R01 выявили идентичные антигены. Сыворотка к антигенам фракции 5 *B. anthracis* 575/122 R01 содержит антитела к ряду белков, в том числе к ПА, выделенному электрофорезом.

Обсуждение. В ходе работы была установлена антигенная идентичность иммунодоминантных белков, выделенных гель-хроматографией и электрофорезом.

Заключение. Таким образом, нами в электрофорезе и гель-хроматографией выделены белок EA1 и ПА, которые могут быть использованы для получения моноклональных и поликлональных моноспецифических антител, пригодных для конструирования диагностических препаратов.

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*, протективный антиген, белок EA1, гель-хроматография, электрофорез, реакция иммунодиффузии, антигенная идентичность

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Все работы с экспериментальными животными согласованы и утверждены в рамках темы 084-3-15 «Детекция иммунодоминантных антигенов штаммов *Bacillus anthracis* с различным набором плазмид вирулентности» на заседании комиссии Волгоградского научно-исследовательского противочумного института по биоэтике (протокол № 2 от 22.05.2016).

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: Ижбердеева М.П., Сауткина А.А., Баркова И.А., Викторов Д.В. Антигенная идентичность иммунодоминантных белков геновариантов *Bacillus anthracis*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(2):203–208.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-284> EDN: <https://www.elibrary.ru/nycsch>

Antigenic identity of immunodominant proteins of *Bacillus anthracis* genovariants

Margarita P. Izhberdeeva[✉], Anastasiya A. Sautkina, Irina A. Barkova, **Dmitry V. Victorov**

Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russia

Abstract

Introduction. The main biological raw materials for the production of immunobiological preparations for identification of *Bacillus anthracis* are its specific antigens, the protective antigen and the EA1 protein.

Purpose. To determine the antigenic identity of immunodominant proteins of different genovariants of *B. anthracis* isolated by gel chromatography and electrophoresis.

Materials and methods. Culture filtrates of isogenic variants of *B. anthracis* strain 575/122 (pXO1⁺, pXO2⁺): R01 (pXO1⁺, pXO2⁻); R00 (pXO1⁻, pXO2⁻) were used in the study. Gel chromatographic fractionation and electrophoretic separation were carried out according to standard methods. The antigenic properties of proteins isolated by gel chromatography and electrophoresis were studied by immunodiffusion with polyclonal monospecific sera against the protective antigen and the EA1 protein of the S-layer.

Results. Gel chromatographic separation of *B. anthracis* 575/122 culture filtrates R01 (pXO1⁺, pXO2⁻) and R00 (pXO1⁻, pXO2⁻) yielded fractions 1 and 5. Sera against EA1 protein and antigens of fraction 1 of strains *B. anthracis* 575/122 R00 and *B. anthracis* 575/122 R01 culture filtrates identified the identical antigens. Serum against antigens of fraction 5 of *B. anthracis* 575/122 R01 contained antibodies to numerous proteins, including the protective antigen isolated by electrophoresis.

Discussion. The antigenic identity of immunodominant proteins isolated by gel chromatography and electrophoresis was identified.

Conclusion. EA1 and PA proteins isolated by electrophoresis and gel chromatography can be used for production of monoclonal and polyclonal monospecific antibodies suitable for the design of diagnostic preparations.

Keywords: *Bacillus anthracis*, protective antigen, EA1 protein, gel chromatography, electrophoresis, immunodiffusion reaction, antigenic identity.

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). All work with experimental animals was agreed and approved within the framework of topic 084-3-15 "Detection of immunodominant antigens of *Bacillus anthracis* strains with a different set of virulence plasmids" at a meeting of the commission of the Volgograd Research Anti-Plague Institute on Bioethics (protocol No. 2 of May 22, 2016).

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: Izhberdeeva M.P., Sautkina A.A., Barkova I.A., Victorov D.V. Antigenic identity of immunodominant proteins of *Bacillus anthracis* genovariants. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2023;100(2):203–208.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-284> EDN: <https://www.elibrary.ru/nycsch>

Введение

Основным биологическим сырьём при производстве иммунобиологических препаратов являются специфические антигены, выделенные из микробных биомасс, и иммунные сыворотки, полученные на их основе. При многообразии способов извлечения специфических антигенов из микробных клеток необходим комплекс последовательных манипуляций, который бы позволил изолировать полноценные в антигенном отношении фракции для производственных целей [1].

В качестве сырья при создании иммунобиологических препаратов для индикации и идентификации *Bacillus anthracis* используются иммунодоминантные белки, в том числе протективный антиген (ПА) и белок поверхностных структур EA1 (extractable antigen) [2–5].

Ранее нами изучены внеклеточные антигены *B. anthracis*, выделенные гель-хроматографией и электрофорезом [6, 7]. Иммунодоминантные белки электрофоретических фракций идентифицированы MALDI-TOF MS как ПА (молекулярная масса (ММ) 85,810 кДа) и EA1 (ММ 91,360 кДа) [8].

Цель работы — определить антигенную идентичность иммунодоминантных белков, выделенных

гель-хроматографией и электрофорезом, различных геновариантов *B. anthracis*.

Материалы и методы

В работе использованы изогенные варианты вирулентного штамма *B. anthracis* 575/122 (pXO1⁺, pXO2⁺): токсинпродуцирующий 575/122 R01 (pXO1⁺, pXO2⁻); бесплазмидный 575/122 R00 (pXO1⁻, pXO2⁻) [9]. Исходный вирулентный штамм был получен в лаборатории коллекционных штаммов Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора (выделен санэпидемслужбой Молдавской ССР из шкуры крупного рогатого скота в июле 1982 г.).

Для получения бесклеточных культуральных фильтратов (КФ) использовали жидкую питательную среду Ristroph (R-среду) pH 8,0–8,3 и R-среду с казеиновыми кислотами («Difco») из расчёта 4 г/л питательной среды [10]. Штаммы культивировали при 37°C в течение 18 ч, при 72 об/мин в биологическом шейкере «Excella E-25/25R» («Eppendorf»). Культуральную жидкость стерилизовали фильтрованием через фильтр ДР045, стерильность определяли высевом на сердечно-мозговой агар и в сердечно-мозговой бульон. КФ концентрировали

на установке ДС 2 «Amicon» с волоконными фильтрами HLP10 («Amicon»), а затем на ультрафильтре РМ10 [6].

Гель-хроматографическое фракционирование с использованием сверхтонкого сефакрила S-300 HR «Pharmacia» в объёме 2,5 × 5,6 см и электрофоретическое разделение в 10% полиакриламидном геле проводили по стандартным методикам [6, 7]. Белки визуализировали в блоке геля охлаждённым раствором 0,1М КСl. Белковые фракции вырезали, гомогенизировали и экстрагировали углекислым аммонием [7].

Кроличьи сыворотки к гель-хроматографическим фракциям и кроличьи моноспецифические поликлональные сыворотки к белку EA1 и ПА получали по методике, описанной ранее [6–8].

Все работы с экспериментальными животными согласованы и утверждены в рамках темы 084-3-15 «Детекция иммунодоминантных антигенов штаммов *Bacillus anthracis* с различным набором плазмид вирулентности» на заседании комиссии по биоэтике (протокол № 2 от 22.05.2016).

Идентичность белков, выделенных гель-хроматографией и электрофорезом [9], определяли в реакции иммунодиффузии (РИД) [11].

Результаты

В ходе работы получены КФ штаммов *B. anthracis* 575/122 R01 (pXO1⁺, pXO2⁻) с содержанием белка 9,8 мг/мл и *B. anthracis* 575/122 R00 (pXO1⁻, pXO2⁻) с содержанием белка 5,5 мг/мл, проведено их гель-хроматографическое разделение. Хроматограммы изогенных вариантов штамма *B. anthracis* 575/122 соответствовали хроматограммам КФ штаммов с аналогичным набором плазмид вирулентности, а именно *B. anthracis* СТИ (pXO1⁺, pXO2⁻) и *B. anthracis* 81/1 R00 (pXO1⁻, pXO2⁻) (рис. 1) [6].

При электрофоретическом разделении белков КФ штамма *B. anthracis* 575/122 R01 определялся преимущественно белок с ММ 85,810 кДа, который был идентифицирован в MALDI-TOF MS как ПА, а КФ *B. anthracis* 575/122 R00 содержал белки: 91,361 кДа, идентифицированный как EA1 [8], и ММ 87 кДа, который в MALDI-TOF MS не удалось определить, однако по ММ он совпадал с белком Sap *B. anthracis* (86,7 кДа) [12].

К электрофоретическим фракциям были получены кроличьи иммунные поликлональные сыворотки, которые использовались для постановки РИД с КФ *B. anthracis* 575/122 R01. Иммунопреципитаты к белкам S-слоя образовывались через 2 ч (рис. 2, а), а к ПА — через 18 ч (рис. 2, б).

Для определения в РИД идентичности белков гель-хроматографических и электрофоретических фракций использованы КФ штаммов *B. anthracis* 575/122 R01 и *B. anthracis* 575/122 R00; сыворотки

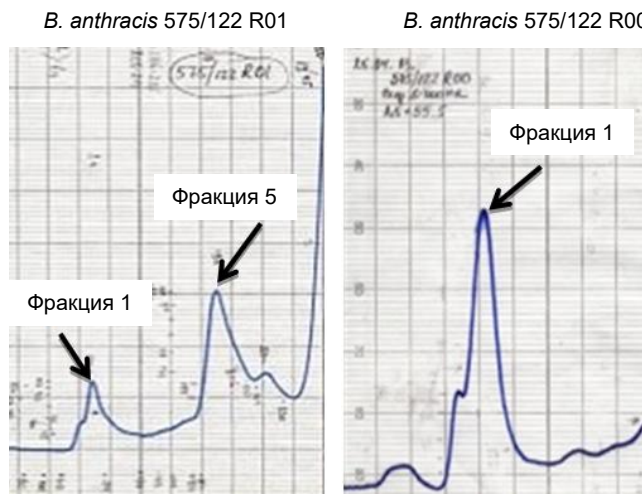


Рис. 1. Хроматограммы культуральных фильтратов *B. anthracis*.

Fig. 1. Chromatograms of *B. anthracis* culture filtrates.

к фракции 1 КФ *B. anthracis* 575/122 R01 и 575/122 R00 и фракции 5 КФ *B. anthracis* 575/122 R01; сыворотки к белку EA1, белку ММ 87 кДа и к ПА КФ *B. anthracis* 575/122 R01.

В результате РИД белки фракции 1 КФ *B. anthracis* 575/122 R01 и 575/122 R00 и белки EA1 и 575/122 R00 ММ 87 кДа, выделенные электрофорезом, образовывали идентичную иммунопреципитующую линию.

Сыворотка к фракции 5 штамма *B. anthracis* 575/122 R01 формировала иммунопреципитаты как с КФ *B. anthracis* 575/122 R01, так и с КФ *B. anthracis* 575/122 R00. Сыворотка к ПА, выделенному в элек-

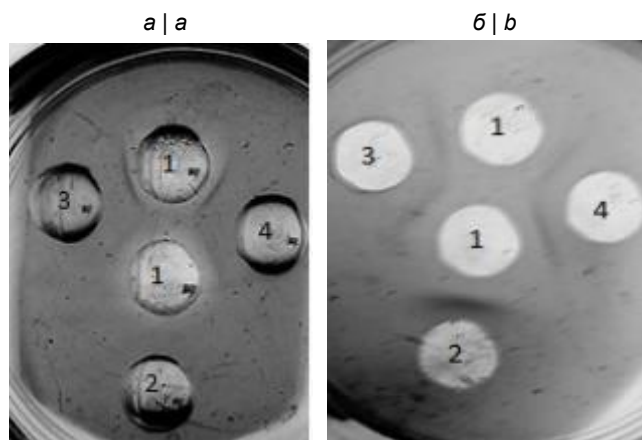


Рис. 2. РИД в геле белков электрофоретических фракций РИД через 2 ч (а) и через 18 ч (б).

1 — сыворотка к КФ *B. anthracis* 575/122 R01; 2 — ПА *B. anthracis* 575/122 R01; 3 — EA1 *B. anthracis* 575/122 R00; 4 — белок *B. anthracis* 575/122 R00 ММ 87 кДа.

Fig. 2. Gel immunodiffusion of proteins from electrophoretic fractions after 2 hours (a) and 18 hours (b) incubation.

1 — serum to culture filtrate of *B. anthracis* 575/122 R01; 2 — protective antigen of *B. anthracis* 575/122 R01; 3 — EA1 *B. anthracis* 575/122 R00; 4 — 87 kDa protein of *B. anthracis* 575/122 R00.

трофорезе, образовывала одну гомогенную линию с КФ *B. anthracis* 575/122 R01, с *B. anthracis* 575/122 R00 преципитирующих линий не выявлено (рис. 3).

Обсуждение

Для конструирования диагностических тест-систем основными мишенями являются специфические антигены возбудителей заболеваний и иммунные сыворотки на их основе. Для *B. anthracis* в настоящее время таковыми являются белок EA1 и ПА [2–4, 13–15].

Существует достаточно большое количество эффективных методик получения антигенов из микробных клеток. Нами в течение ряда лет были освоены способы выделения ПА и белка EA1. Изучена видовая специфичность сывороток к белкам, выделенным гель-хроматографией из КФ штаммов *B. anthracis* с различным содержанием плазмид вирулентности, определена возможность использования ПА для обнаружения антител в реакции непрямой геммагглютинации и в твердофазном иммуноферментном методе, а белка EA1 возбудителя сибирской язвы — в методе флуоресцирующих антител [6, 16, 17]. В последующих исследованиях данные белки были выделены из КФ изогенных вариантов *B. anthracis*, накоплены в препаративном электрофорезе, идентифицированы в MALDI-TOF MS, а также определено их диагностическое значение [7–9].

Целью настоящей работы являлось установление идентичности антигенов, выделенных гель-хроматографией и электрофорезом, различных геновариантов *B. anthracis*. Для этого были получены гипериммунные кроличьи сыворотки. Процесс получения сывороток к гель-хроматографическим фракциям занимал меньше времени. Для получения сывороток к белкам EA1 и MM 87 кДа нам понадобилось около 18 мес. При гель-проникающей хроматографии происходит разделение по молекулярным весам, но тонкая очистка невозможна, и фракции содержат смесь антигенов с преобладанием того или другого. В нашей работе в РИД сыворотки к белкам EA1 и MM 87 кДа, выделенным из полиакриламидного геля, а также сыворотки к первым фракциям КФ бесплазмидного и токсинпродуцирующего штаммов выявили идентичные антигены. Следовательно, в данных гель-хроматографических фракциях содержатся белки S-слоя MM 94 и 87 кДа (EA1 и Sap) [12]. Сыворотка к ПА *B. anthracis* 575/122 R01, выделенному электрофорезом, в отличие от сыворотки к фракции 5, образовывала одну четкую гомогенную линию с КФ *B. anthracis* 575/122 R01, а с КФ *B. anthracis* 575/122 R00 иммунопреципитатов не выявлено. Препаративный электрофорез позволяет не только определять MM белков с точностью до 5%, но и даёт высокое разрешение, переводит в растворимую форму большинство белков, которые

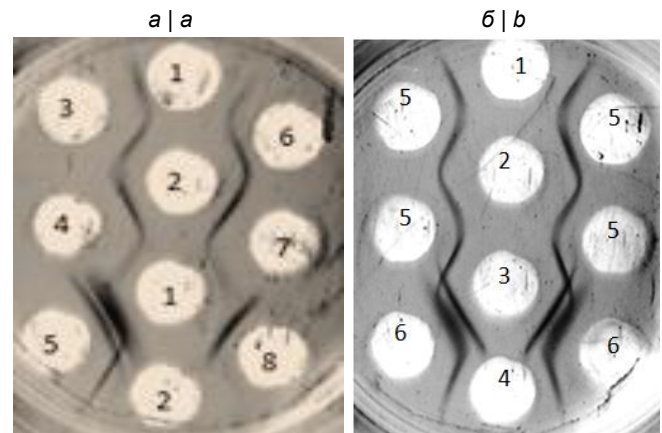


Рис. 3. Антигены, выявляемые сыворотками к белкам гель-хроматографических и электрофоретических фракций.

а: 1 — КФ *B. anthracis* 575/122 R01; 2 — КФ *B. anthracis* 575/122 R00; 3 — сыворотка к белку EA1 КФ *B. anthracis* 575/122 R00; 4 — сыворотка к фракции 1 КФ *B. anthracis* 575/122 R01; 5 — сыворотка к фракции 5 КФ *B. anthracis* 575/122 R01; 6 — сыворотка к фракции 1 КФ *B. anthracis* 575/122 R00; 7 — сыворотка к белку КФ *B. anthracis* 575/122 R00 MM 87 кДа; 8 — сыворотка к ПА КФ *B. anthracis* 575/122 R01;

б: 1 — сыворотка к фракции 1 КФ *B. anthracis* 575/122 R01; 2 — сыворотка к белку EA1 КФ *B. anthracis* 575/122 R00; 3 — сыворотка к фракции 5 КФ *B. anthracis* 575/122 R01; 4 — сыворотка к ПА КФ *B. anthracis* 575/122 R01; 5 — КФ *B. anthracis* 575/122 R00; 6 — КФ *B. anthracis* 575/122 R01.

Fig. 3. Antigens detected by sera to proteins from fractions separated in gel-chromatography and electrophoresis.

a: 1 — culture filtrate of *B. anthracis* 575/122 R01; 2 — culture filtrate of *B. anthracis* 575/122 R00; 3 — serum to EA1 protein from *B. anthracis* 575/122 R00 culture filtrate; 4 — serum to fraction 1 of *B. anthracis* 575/122 R01 culture filtrate; 5 — serum to fraction 5 of *B. anthracis* 575/122 R01 culture filtrate; 6 — serum to fraction 1 of *B. anthracis* 575/122 R00 culture filtrate; 7 — serum to 87 kDa protein from *B. anthracis* 575/122 R00 culture filtrate; 8 — serum to protective antigen from *B. anthracis* 575/122 R01 culture filtrate; **b:** 1 — serum to fraction 1 of *B. anthracis* 575/122 R01 culture filtrate; 2 — serum to EA1 protein from *B. anthracis* 575/122 R00 culture filtrate; 3 — serum to fraction 5 of *B. anthracis* 575/122 R01 culture filtrate; 4 — serum to protective antigen of *B. anthracis* 575/122 R01 culture filtrate; 5 — culture filtrate of *B. anthracis* 575/122 R00; 6 — culture filtrate of *B. anthracis* 575/122 R01.

нельзя солиubilизировать другими методами [18]. Происходит более эффективное разделение белков, чем гель-хроматографией, что подтверждено данными иммуноблотинга [7].

Важнейшим качеством, определяющим иммуногенность антигенов, являются размер молекулы, доза вводимого антигена, пространственная структура белка. Смесь белковых компонентов вызывает более выраженный иммунный ответ, чем введение очищенного антигена [19], что объясняет длительность получения сывороток к белкам, выделенным электрофорезом.

Таким образом, нами при помощи электрофореза и гель-хроматографии в препаративных количествах накоплен ряд идентичных белков геновариантов *B. anthracis*, что в дальнейшем позволит использовать данные методики при разработке

схем иммунизации для получения моноклональных и поликлональных моноспецифических антител, пригодных для конструирования диагностических препаратов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Тюменцева И.С., Жарникова И.В., Афанасьев Е.Н. и др. Научно-методические разработки биотехнологий производства иммунобиологических препаратов для экспресс-диагностики инфекционных заболеваний и детекции их возбудителей. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2015;(4):21–5. Tyumentseva I.S., Zharnikova I.V., Afanas'ev E.N., et al. Scientific and methodical development of biotechnological production of immunobiological preparations for instant diagnosis of infectious diseases and detection of pathogens. *Biopreparation. Prevention, diagnosis, treatment*. 2015;(4):21–5. EDN: <https://www.elibrary.ru/vaehbl>
2. Wang D., Yang R., Zhang Z.P., et al. Detection of *B. anthracis* spores and vegetative cells with the same monoclonal antibodies. *PLoS One*. 2009;4(11):e7810. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007810>
3. Makam S., Kingston J., Ramakrishna U., et al. Application of extractable antigen 1 (EA1) for specific detection of *Bacillus anthracis* cells. *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* 2013;4(2):274–83.
4. Walper S.A., Anderson G.P., Brozozog P.A., et al. Rugged single domain antibody detection elements for *Bacillus anthracis* spores and vegetative cells. *PLoS One*. 2012;7(3):e32801. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032801>
5. Alexander N.W., Brian N.W., Shihui L., et al. Small molecule inhibitors of *Bacillus anthracis* protective antigen proteolytic activation and oligomerization. *J. Med. Chem.* 2012;55(18):7998–8006. DOI: <https://doi.org/10.1021/jm300804e>
6. Баркова И.А., Барков А.М., Алексеев В.В. и др. Продукция белков S — слоя разными штаммами *Bacillus anthracis*. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2008;(4):29–32. Barkova I.A., Barkov A.M., Alekseev V.V., et al. Production of S-layer proteins by different *Bacillus anthracis* strains. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2008;(4):29–32. DOI: [https://doi.org/10.21055/0370-1069-2008-4\(98\)-29-32](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2008-4(98)-29-32) EDN: <https://www.elibrary.ru/kvekch>
7. Баркова И.А., Червакова М.П., Барков А.М. и др. Диагностическое значение некоторых иммунодоминантных белков изогенных вариантов *Bacillus anthracis*. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016;61(12):833–8. Barkova I.A., Chervakova M.P., Barkov A.M., et al. The diagnostic significance of particular immune-dominating proteins of isogenic variants of *Bacillus anthracis*. *Clinical Laboratory Diagnostics*. 2016;61(12):833–8. DOI: <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2016-61-12-833-837> EDN: <https://www.elibrary.ru/xscft>
8. Червакова М.П., Шаров Т.Н., Баркова И.А. и др. Идентификация иммуногены белков штаммов *Bacillus anthracis* в MALDI TOF MS. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2018;95(1):52–7. Chervakova M.P., Sharov T.N., Berkova I.A., et al. Identification of immunogenic proteins of strains of *Bacillus anthracis* in MALDI TOF MS. *Journal of Microbiology Epidemiology and Immunobiology*. 2018;95(1):52–7. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-1-52-57> EDN: <https://www.elibrary.ru/yxtuxr>
9. Баркова И.А., Новоженина А.В., Барков А.М. и др. Характеристика изогенных вариантов *Bacillus anthracis* с различным содержанием плазмид вирулентности. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2015;92(1):17–22. Barkova I.A., Novozhenina A.V., Barkov A.M. Characteristics of isogenic variants of *Bacillus anthracis* with various content of virulence plasmids. *Journal of Microbiology Epidemiology and Immunobiology*. 2015;92(1):17–22. EDN: <https://www.elibrary.ru/vobdpf>
10. Маринин Л.И., Онищенко Г.Г., Степанов А.В. и др. *Микробиологическая диагностика сибирской язвы*. М.; 1999. Marinin L.I., Onishchenko G.G., Stepanov A.V., et al. *Microbiological Diagnostics of Anthrax*. Moscow; 1999.
11. Баркова И.А., Липницкий А.В., Барков А.М., Евтеева Е.В. Использование иммуноглобулинов к отдельным внеклеточным антигенам *Bacillus anthracis* СТИ для идентификации сибиреязвенного микроба. *Биотехнология*. 2005;(2):91–6. Barkova I.A., Lipnitskiy A.V., Barkov A.M., Evteeva E.V. Use of immunoglobulins to individual extracellular antigens of *Bacillus anthracis* STI for identification of the anthrax microbe. *Biotechnology in Russia*. 2005;(2):91–6. EDN: <https://www.elibrary.ru/hvtscr>
12. Lamonica J.M., Wagner M., Eschenbrenner M., et al. Comparative secretome analyses of three *Bacillus anthracis* strains with variant plasmid contents. *Infect. Immun.* 2005;73(6):3646–58. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.73.6.3646-3658.2005>
13. Love T.E., Redmond C., Mayers C.N. Real time detection of anthrax spores using highly specific anti-EA1 recombinant antibodies produced by competitive panning. *J. Immunol. Methods*. 2008;334(1-2):1–10. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2007.12.022>
14. Хлынцова А.Е., Лунева Н.М., Белова Е.В. и др. Разработка и испытания диагностикума на основе моноклональных антител для определения спор возбудителя сибирской язвы в реакции латекс-агглютинации. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2011;4:71–5. Khlintseva A.E., Luneva N.M., Belova E.V., et al. Development and testing of monoclonal antibodies-based diagnostic preparation for *Bacillus anthracis* spores detection using latex agglutination method. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2011;4:71–5. DOI: [https://doi.org/10.21055/0370-1069-2011-4\(110\)-71-75](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2011-4(110)-71-75) EDN: <https://www.elibrary.ru/ojsmb>
15. Семакова А.П., Микшис Н.И., Попова П.Ю. и др. Повышение эффективности и стабильности прототипа вакцины сибиреязвенной химической на основе рекомбинантного протективного антигена. В кн.: Попова А.Ю., Кутырев В.В., ред. *Общие угрозы — совместные действия. Ответ государств БРИКС на вызовы опасных инфекционных болезней. Материалы международной конференции*. М.; 2015:341–4. Semakova A.P., Mikshis N.I., Popova P.Yu., et al. Improving the effectiveness and stability of the prototype of a chemical anthrax vaccine based on a recombinant protective antigen. In: Popova A.Yu., Kutuyev V.V., eds. *Common Threats are Joint Actions. The Response of the BRICS States to the Challenges of Dangerous Infectious Diseases: Materials of the International Conference*. Moscow; 2015:341–4. EDN: <https://www.elibrary.ru/vwuizx>
16. Баркова И.А., Барков А.М., Алексеев В.В., Липницкий А.В. Видоспецифические сыворотки против антигенов поверхностных структур штаммов *Bacillus anthracis*. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2010;(11):51–3. Barkova I.A., Barkov A.M., Alekseev V.V., Lipnitskii A.V. Species-specific sera against antigens of the surface structures of *Bacillus anthracis* strains. *Clinical Laboratory Diagnostics*. 2010;(11):51–3. EDN: <https://www.elibrary.ru/nbnhwz>
17. Барков А.М., Баркова И.А., Алексеев В.В. и др. Обнаружение антител к протективному антигену *Bacillus anthracis* с использованием реакции непрямой гемагглютинации и твердофазного иммуноферментного метода. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2010;(3):42–5. Barkov A.M., Barkova I.A., Alekseev V.V., et al. Detection of antibodies to protective antigen of *Bacillus anthracis* using indirect hemagglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2010;(3):42–5. DOI: [https://doi.org/10.21055/0370-1069-2010-3\(105\)-42-45](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2010-3(105)-42-45) EDN: <https://www.elibrary.ru/mumfjl>

18. Гааль Э., Медьеша Г., Верецкеи Л. *Электорофорез в разделении биологических макромолекул*. М.; 1982. Gaal O., Medgyesi G.A., Vereczkey L. *Electrophoresis in the Separation of Biological Macromolecules*. Budapest; 1980.
19. Супрун Е.Н. Часть вторая причина иммунологической реакции. *Аллергология и иммунология в педиатрии*. 2013;(1):26–32. Suprun E.N. Reason of immunological reaction (part 2). *Allergology and Immunology in Pediatrics*. 2013;(1):26–32. EDN: <https://www.elibrary.ru/wxghal>

Информация об авторах

Ижбердеева Маргарита Павловна[✉] — н.с. лаб. биоинформационного анализа Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, Волгоград, Россия, margaritakovylina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2979-4452>

Сауткина Анастасия Александровна — н.с. лаб. оперативной диагностики бактериальных и вирусных инфекций Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6302-443>

Баркова Ирина Анатольевна — к.м.н., доцент, с.н.с. отдела подготовки специалистов Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5036-0034>

Викторов Дмитрий Викторович — д.б.н., доцент, зам. директора по научно-экспериментальной работе Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2722-7948>

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

Статья поступила в редакцию 10.12.2023;
принята к публикации 15.02.2023;
опубликована 28.04.2023

Information about the authors

Margarita P. Izhberdeeva[✉] — researcher, Laboratory of bioinformatic analysis, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russia, margaritakovylina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2979-4452>

Anastasiya A. Sautkina — researcher, Laboratory of the operative diagnostic of bacterial and viral infections, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6302-4438>

Irina A. Barkova — Cand. Sci. (Med.), assistant professor, senior researcher, Specialist training department, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5036-0034>

Dmitry V. Viktorov — D. Sci. (Biol.), assistant professor, assistant director for science and experiment issues, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2722-7948>

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

The article was submitted 10.12.2023;
accepted for publication 15.02.2023;
published 28.04.2023



Влияние повидон-йода на чувствительность клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae* к антибиотикам

Циркунова Ж.Ф.[✉], Емельянова А.А., Гудкова Е.И., Скороход Г.А.

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

Аннотация

Введение. Развитие устойчивости микроорганизмов к антибиотикам на фоне использования биоцидов в субингибирующих концентрациях является актуальной проблемой современного здравоохранения.

Цель работы — изучить влияние повидон-йода на чувствительность клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae* к антибиотикам.

Материалы и методы. В работе проанализировано влияние повидон-йода в субингибирующих концентрациях на изменение чувствительности клинических изолятов *K. pneumoniae* ($n = 9$) к антибактериальным средствам ($n = 15$). Адаптацию бактерий к повидон-йоду проводили с использованием периодического культивирования микроорганизмов, которое осуществляли в 96-луночных культуральных планшетах для суспензионных культур (non-treated) без перемешивания. Оценку чувствительности бактерий к антибиотикам проводили с помощью автоматического анализатора «Vitek2Compact» («BioMerieux») с использованием карт AST-204.

Результаты. В ходе адаптации клинических изолятов *K. pneumoniae* к повидон-йоду показано увеличение чувствительности бактерий к антибиотикам. Минимальные ингибирующие концентрации 11 антибактериальных средств в отношении изученных культур снизились в среднем в 2,35–23,2 раза по сравнению с контрольными значениями. В условиях опыта чувствительность изученных культур возросла к амоксициллин/клавулановой кислоте в $\geq 2 - \geq 8$ раз, пиперациллин/тазобактаму — в $\geq 2 - \geq 32$ раза, цефтазидиму — $4 - \geq 16$ раз, амикацину — в $2 - \geq 16$ раз, эртапенему — в 2–8 раз, меропинему — в 2–8 раз, цефепиму — $\geq 4 - \geq 64$ раз, ципрофлоксацину — в $4 - \geq 16$ раз, гентамицину — в $2 - \geq 8$ раз, норфлоксацину — в 2–8 раз, нитрофурантоину — в 2–4 раза. Повышение уровня чувствительности к антибиотикам выявлено у 50–100% изученных клинических изолятов бактерий. Подобный эффект не был установлен для ампициллина, цефотаксима, имипенема и триметоприм/сульфаметоксазола. В условиях опыта была выявлена внутривидовая гетерогенность клинических изолятов *K. pneumoniae* по уровню приобретённой чувствительности к антибактериальным средствам.

Обсуждение. Полученные нами результаты не описаны в научной литературе и требуют дальнейшего изучения и объяснения.

Ключевые слова: антисептики, повидон-йод, бетадин, антибиотики, чувствительность

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Белорусского государственного медицинского университета (протокол № 15 от 27.06.2019).

Источник финансирования. Исследования финансировались Министерством здравоохранения Республики Беларусь в рамках задания 3.11 «Изучить влияние сублетальных концентраций биоцидов (антисептиков и дезинфектантов) на формирование множественной устойчивости микроорганизмов-возбудителей оппортунистических инфекций к противомикробным средствам» Государственной программы научных исследований 4 «Трансляционная медицина» подпрограммы 4.2 «Фундаментальные аспекты медицинской науки» (2021–2025 гг.).

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

Для цитирования: Циркунова Ж.Ф., Емельянова А.А., Гудкова Е.И., Скороход Г.А. Влияние повидон-йода на чувствительность клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae* к антибиотикам. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(2):209–218.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-350> EDN: <https://www.elibrary.ru/nynjph>

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-350>

Influence of povidone-iodine on the sensitivity of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* to antibiotics

Zhanna F. Tsirkunova[✉], Alesya A. Emelyanova, Elena I. Gudkova, Gennady A. Skorokhod

Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Abstract

Introduction. Cross-resistance of microorganisms to antibiotics against the background of the use of biocides in subinhibitory concentrations is an urgent problem of modern health care.

The aim of the work is to study the effect of povidone-iodine on the sensitivity of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* to antibiotics.

Materials and methods. The work analyzed the effect of povidone-iodine at subinhibitory concentrations on changes in the sensitivity of clinical isolates of *K. pneumoniae* ($n = 9$) to antibacterial agents ($n = 15$). Adaptation of bacteria to povidone-iodine was carried out using periodic cultivation of microorganisms, which was carried out in 96-well culture plates for suspension cultures (non-treated) without stirring. The sensitivity of bacteria to antibiotics was assessed using an automatic analyzer "Vitek2Compact" ("BioMerieux") using AST-204 charts.

Results. During the adaptation of clinical isolates of *K. pneumoniae* to povidone-iodine, an increase in the sensitivity of bacteria to antibiotics was shown. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of 11 antibacterial agents in relation to the studied cultures decreased by an average of 2.35–23.2 times compared with the control values. Under the experimental conditions, the sensitivity of the studied cultures increased to amoxicillin/clavulanic acid by $\geq 2 - \geq 8$ times, piperacillin/tazobactam — by $\geq 2 - \geq 32$ times, ceftazidime — by $4 - \geq 16$ times, amikacin — $2 - \geq 16$ times, ertapenem — 2.0–8.0 times, meropenem — 2–8 times, cefepim — $\geq 4 - \geq 64$ times, ciprofloxacin — $4 - \geq 16$ times, gentamicin — $2 - \geq 8$ times, norfloxacin — 2–8 times, nitrofurantoin — 2–4 times. An increase in the level of sensitivity to antibiotics was found in 50–100% of the studied clinical bacterial isolates. A similar effect has not been established for ampicillin, cefotaxime, imipenem, and trimethoprim/sulfamethoxazole. It should be noted that under the conditions of the experiment, intraspecific heterogeneity of clinical isolates of *K. pneumoniae* was revealed in terms of the level of acquired sensitivity to antibacterial agents.

Discussion. Our results are not described in the scientific literature and require further study and explanation.

Keywords: antiseptics, povidone-iodine, betadine, antibiotics, sensitivity

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Belarusian State Medical University (protocol No. 15, June 27, 2019).

Funding source. The research was funded by the Ministry of Health of the Republic of Belarus under the task 3.11 "Study the effect of sublethal concentrations of biocides (antiseptics and disinfectants) on the formation of multiple resistance of microorganisms-causative agents of opportunistic infections to antimicrobial agents" of the State Research Program 4 "Translational Medicine" subprogram 4.2 "Fundamental Aspects of Medical Science" (2021–2025).

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

For citation: Tsirkunova Zh.F., Emelyanova A.A., Gudkova E.I., Skorokhod G.A. Influence of povidone-iodine on the sensitivity of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* to antibiotics. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2023;100(2):209–218.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-350> EDN: <https://www.elibrary.ru/nynjph>

Введение

В последние десятилетия отмечается значительный рост заболеваний, вызываемых условно-патогенными микроорганизмами, в том числе *Klebsiella pneumoniae*. Внутрибольничные инфекции, вызванные *K. pneumoniae* и другими грамотрицательными микроорганизмами, стали серьёзной проблемой для здоровья человека, особенно в отделениях реанимации и интенсивной терапии [1–3]. Описанные в научной литературе вспыш-

ки внутрибольничных инфекций были вызваны зачастую микроорганизмами, обладающими множественной устойчивостью к антимикробным средствам [4–6]. Ежегодно инфекции, вызванные резистентными бактериями, приводят к 68 000 смертей в странах европейской экономической зоны и США вместе взятых [7] и наносят экономический ущерб в размере 55 млрд евро в США и 1,6 млрд евро в странах европейской экономической зоны [6, 8].

Уменьшение частоты возникновения и развития внутрибольничных инфекций напрямую связано с эффективностью проводимых профилактических мероприятий. Однако активное и зачастую бесконтрольное применение антисептических и дезинфицирующих средств может привести к развитию устойчивости микроорганизмов как к ним самим, так и к антибиотикам [9–11]. Обзор научной литературы, посвящённой влиянию 13 биоцидных агентов в сублетальных концентрациях на развитие устойчивости к антибиотикам у грамотрицательных бактерий, продемонстрировал наличие перекрёстной устойчивости после воздействия на микроорганизмы хлоргексидина, бензалкония хлорида, триклозана, октенидина, гипохлорита натрия, хлорида дидецилдиметиламмония [12]. В 11 исследованиях, проведённых в разных странах в 2007–2017 гг., показано снижение чувствительности грамотрицательных бактерий к различным антибиотикам после воздействия на них бензалкония хлорида — увеличение минимальных ингибирующих концентраций (МИК) антибиотиков. Приобретённая резистентность чаще всего обнаруживалась к ампициллину, цефотаксиму и сульфаметоксазолу, реже — к цефтазидиму, триметоприм/сульфаметоксазолу, триметоприму, тетрациклину, имипенему, хлорамфениколу, амоксициллину и амоксициллин/клавулановой кислоте [12]. Ряд исследований демонстрируют корреляцию между приобретённой толерантностью к хлоргексидину и устойчивостью бактерий к цефтазидиму, сульфаметоксазолу, имипенему, цефотаксиму, карбапенему, аминогликозиду, тетрациклину и ципрофлоксацину [12]. Имеются данные, что воздействие субингибирующих концентраций хлоргексидина на клинические изоляты *K. pneumoniae* приводит к развитию устойчивости бактерий как к хлоргексидину, так и к колистину [13], который относится к группе полимиксинов и является антибиотиком группы резерва.

Особое место среди антимикробных веществ занимает широко используемый антисептик повидон-йод, который обычно применяется в клинической практике для обработки кожи и слизистых оболочек до и после операций, обработки кожи перед инъекциями, взятием крови, пункцией, биопсией, трансфузией, инфузией и другими инвазивными манипуляциями. Многочисленные исследования показали, что он обладает более широким спектром антимикробного действия, чем многие доступные антисептики, включая хлоргексидин и четвертичные аммониевые соединения [14, 15].

подавляющее большинство исследований показывают, что развитие адаптивной и/или перекрёстной устойчивости микроорганизмов к антибиотикам не наблюдается после воздействия на них сублетальных концентраций повидон-йода [12, 14–18]. Однако есть единичные данные о

снижении чувствительности бактерий в результате воздействия на них данного биоцида. Так, В. Merchel Piovesan Pereira и соавт. выделили клоны *Escherichia coli* с повышенной устойчивостью к повидон-йоду, которые были также менее чувствительны к ампициллину, хлорамфениколу и норфлоксацину [19]. Воздействие субингибирующих концентраций повидон-йода на *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 в течение 10 последовательных пассажей приводило к двукратному увеличению МИК — с 5000 мкг/мл в отношении исходного штамма до 10 000 мкг/мл для адаптированного, однако после последовательного пассирования адаптированного варианта на среде без биоцида значение МИК возвращалось к исходному значению [20].

Учитывая, что повидон-йод продолжает активно использоваться в клинической практике и быту, представляются интересными и актуальными исследования влияния низких концентраций (не приводящих к гибели бактериальных клеток) данного антисептика на микроорганизмы и их чувствительность к антибиотикам.

Цель работы — изучить влияние повидон-йода на чувствительность клинических изолятов *K. pneumoniae* к антибиотикам.

Материалы и методы

Объектами исследования явились клинические изоляты *K. pneumoniae* ($n = 9$) выделенные в 2021 г. от пациентов, находящихся на стационарном лечении в отделениях различного профиля г. Минска. Клинические изоляты были выделены из образцов крови; мочи; мокроты или лаважной жидкости; мазков или соскобов из полости рта, зева, глотки, уха, ануса; отделяемого из дренажей и ран при количественном посеве на питательные среды. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Белорусского государственного медицинского университета (протокол (протокол № 15 от 27.06.2019).

В качестве типовой тест-культуры использовали *K. pneumoniae* ATCC 700603. Бактерии культивировали на питательных средах: триптиказо-соевом бульоне («HiMedia», Индия), триптиказо-соевом агаре («HiMedia») при $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

Чувствительность бактерий к антибиотикам оценивали с помощью автоматического анализатора «Vitek2Compact» («BioMérieux») и карт AST-204.

Устойчивость клинических изолятов бактерий к повидон-йоду определяли методом серийных разведений в плотной питательной среде (агаре) и методом серийных микроразведений в жидкой питательной среде (бульоне), используя двукратное разведение каждого антибактериального вещества. Значения МИК, определённые методом серийных микроразведений в бульоне, были использованы

для расчёта субингибирующих концентраций биоцида в жидкой питательной среде, на которой велась адаптация микроорганизмов. Более быстрый и менее трудоёмкий метод, а именно метод разведений в агаре, применяли для анализа динамики изменения уровней чувствительности бактерий в процессе их адаптации к биоцидам. В исследованиях использовали 10% раствор повидон-йода с концентрацией активного йода 1% (коммерческое название «Бетадин» («EGIS Pharmaceuticals PLC»). МИК выражали в % по повидон-йоду.

Влияние повидон-йода на изменение чувствительности *K. pneumoniae* к антибиотикам изучали в процессе адаптации бактерий к субингибирующим концентрациям биоцида в условиях постоянного повышения его концентрации в питательной среде. Адаптацию проводили с использованием периодического культивирования микроорганизмов, которое осуществляли в 96-луночных культуральных планшетах для суспензионных культур (non-treated) без перемешивания. Концентрацию повидон-йода в питательной среде увеличивали постепенно, раз в неделю увеличивая количество биоцида, тем самым адаптируя бактерии к повышающейся концентрации антимикробного вещества. Начальная концентрация повидон-йода, с которой началась адаптация, — $1/_{16}$ МИК (определённая методом серийных микроразведений в бульоне), конечная концентрация — $1/_{2}$ МИК (определённая методом серийных микроразведений в бульоне).

Контрольные значения МИК антибиотиков определяли для клинических изолятов бактерий, подвергшихся многократному перепассированию на питательной среде, параллельно с опытными культурами, но без добавления повидон-йода в питательную среду (МИК₁), опытные значения МИК антибиотиков определяли для бактерий после их адаптации к повидон-йоду (МИК₂). Степень изменения чувствительности бактерий к антибиотикам оценивали по соотношению МИК₁/МИК₂. Если это соотношение было больше 1,0, делали вывод, что чувствительность бактерий к антибиотикам возросла, если меньше 1,0 — снизилась.

Перед определением чувствительности бактерий к антибиотикам каждую опытную и контрольную культуры *K. pneumoniae* пересевали на триптиказо-соевый агар без биоцида, отбирали по несколько морфологически схожих колоний чистой 18–24-часовой культуры бактерий, суспендировали их в стерильном изотоническом растворе и доводили оптическую плотность инокулюма до 0,50–0,63 по МакФарланду с использованием денситометра «Vitek2Compact» («BioMerieux»).

Ввод, статистическую обработку и анализ данных производили с помощью компьютерных программ «MS Excel v. 7.0» («Microsoft») и «Statistica v. 6.0» («StatSoft»).

Результаты

Полученные результаты по влиянию повидон-йода на изменение чувствительности 9 клинических изолятов и 1 типовой культуры *K. pneumoniae* представлены на **рис. 1–4**. При построении рисунков мы не учитывали знаки « \geq » и « \leq ». Полные значения МИК антибиотиков представлены в табличных данных к рисункам.

Культивирование и многократное перепассирование (54 пассажа) клинических изолятов *K. pneumoniae* на средах с сублетальными концентрациями повидон-йода приводило к повышению чувствительности бактерий к ряду антибиотиков.

МИК антибиотиков в отношении изученных культур снизились в среднем в 2,35–23,2 раза по сравнению с контрольными значениями. В условиях опыта чувствительность изученных культур возросла к амоксициллин/клавулановой кислоте в $\geq 2 - \geq 8$ раз, пиперациллин/тазобактаму — в $\geq 2 - \geq 32$ раза, цефтазидиму — в $4 - \geq 16$ раз, амикацину — в $2 - \geq 16$ раз, эртапенему — в $2 - 8$ раз, меропинему — в $2 - 8$ раз, цефепиму — в $\geq 4 - \geq 64$ раз, ципрофлоксацину — в $4 - \geq 16$ раз, гентамицину — в $2 - \geq 8$ раз, норфлоксацину — в $2 - 8$ раз, нитрофурантоину — в $2 - 4$ раза.

Из данных, представленных в таблицах к рисункам, видно, что повышение уровня чувствительности к антибиотикам варьировало от 50–60% взятых в опыт клинических изолятов *K. pneumoniae* (в отношении цефепима и эртапенема) до 90–100% (в отношении амоксициллин/клавулановой кислоты, ципрофлоксацина и гентамицина).

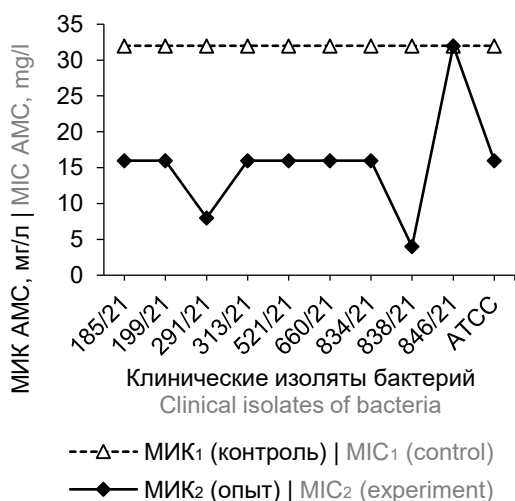
Подобное действие повидон-йода не было отмечено в отношении чувствительности изученных бактерий к ампициллину, цефотаксиму, имипенему, триметоприм/сульфаметоксазолу.

Для примера на **рис. 5** представлены данные по определению чувствительности клинического изолята *K. pneumoniae* № 199/21 к антибиотикам до и после адаптации к повидон-йоду.

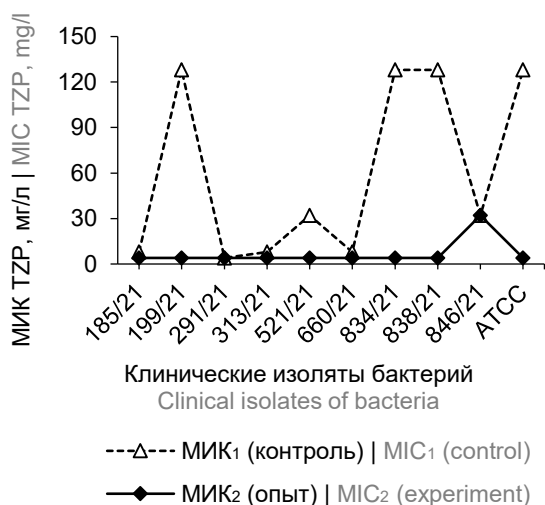
Обсуждение

В настоящее время активно обсуждается способность микроорганизмов вырабатывать перекрёстную устойчивость к антибиотикам на фоне воздействия на них субингибирующих концентраций различных биоцидов [9–13]. Причины возникновения такой устойчивости бактерий к антибиотикам могут быть различными [9–13, 22–24].

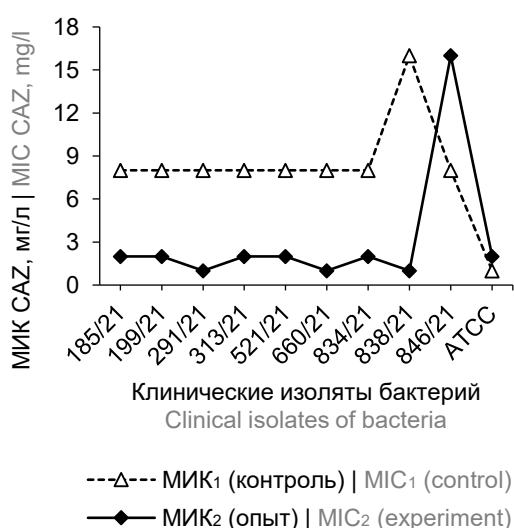
В изученной нами научной литературе нет данных, что повидон-йод повышает чувствительность микроорганизмов к антибиотикам. Сложно сказать, чем может быть обусловлен установленный нами феномен. Повидон-йод — один из наиболее широко используемых антисептиков в настоящее время. Его бактерицидный эффект обусловлен тем, что молекулярный йод, высвобождающийся из комплекса с



№ No.	МИК ₁ MIC ₁	МИК ₂ MIC ₂	МИК ₁ /МИК ₂ MIC ₁ /MIC ₂
185/21	≥ 32,0	16,0	≥ 2,0
199/21	≥ 32,0	16,0	≥ 2,0
291/21	≥ 32,0	8,0	≥ 4,0
313/21	≥ 32,0	16,0	≥ 2,0
521/21	≥ 32,0	16,0	≥ 2,0
660/21	≥ 32,0	16,0	≥ 2,0
834/21	≥ 32,0	16,0	≥ 2,0
838/21	≥ 32,0	4,0	≥ 8,0
846/21	≥ 32,0	≥ 32,0	≥ 1
ATCC	≥ 32,0	16,0	≥ 2
Среднее значение Mean			≥ 2,7 ± 1,7



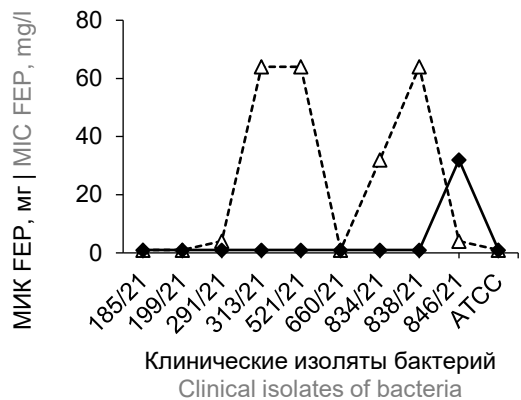
№ No.	МИК ₁ MIC ₁	МИК ₂ MIC ₂	МИК ₁ /МИК ₂ MIC ₁ /MIC ₂
185/21	8,0	≤ 4,0	≥ 2,0
199/21	≥ 128,0	≤ 4,0	≥ 32,0
291/21	≤ 4,0	≤ 4,0	1,0
313/21	8,0	≤ 4,0	≥ 2,0
521/21	32,0	≤ 4,0	≥ 8,0
660/21	8,0	≤ 4,0	≥ 2,0
834/21	≥ 128,0	≤ 4,0	≥ 32,0
838/21	≥ 128,0	≤ 4,0	≥ 32,0
846/21	32,0	32,0	1,0
ATCC	≥ 128,0	≤ 4,0	≥ 32,0
Среднее значение Mean			≥ 14,4 ± 3,9



№ No.	МИК ₁ MIC ₁	МИК ₂ MIC ₂	МИК ₁ /МИК ₂ MIC ₁ /MIC ₂
185/21	8,0	2,0	4,0
199/21	8,0	2,0	4,0
291/21	8,0	≤ 1,0	≥ 8,0
313/21	8,0	2,0	4,0
521/21	8,0	2,0	4,0
660/21	8,0	≤ 1,0	≥ 8,0
834/21	8,0	2,0	4,0
838/21	16,0	≤ 1,0	≥ 16,0
846/21	8,0	16,0	0,5
ATCC	≤ 1,0	2,0	≤ 0,5
Среднее значение Mean			5,3 ± 2,3

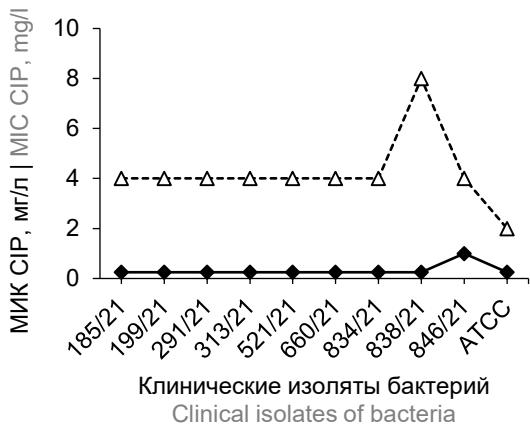
Рис. 1. Влияние повидон-йода на чувствительность клинических изолятов *K. pneumoniae* к амоксициллин/клавулановой кислоте (АМС), пиперациллину/тазобактаму (TZP) и цефтазидиму (CAZ).

Fig. 1. The effect of povidone-iodine on the sensitivity of clinical isolates *K. pneumoniae* to amoxicillin/clavulanic acid (AMC), piperacillin/tazobactam (TZP), and ceftazidime (CAZ).



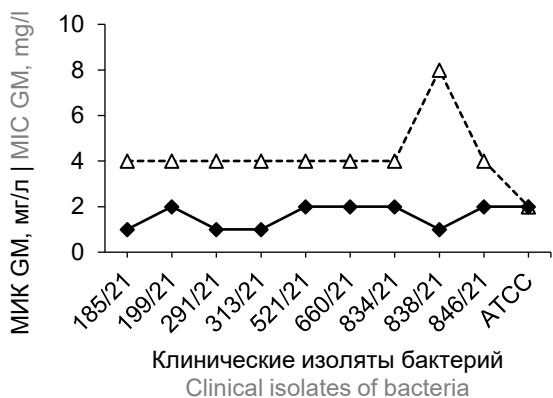
---Δ--- МИК₁ (контроль) | MIC₁ (control)
 —◆— МИК₂ (опыт) | MIC₂ (experiment)

№ No.	МИК ₁ MIC ₁	МИК ₂ MIC ₂	МИК ₁ /МИК ₂ MIC ₁ /MIC ₂
185/21	≤ 1,0	≤ 1,0	1,0
199/21	≤ 1,0	≤ 1,0	1,0
291/21	4,0	≤ 1,0	≥ 4,0
313/21	≥ 64,0	≤ 1,0	≥ 64,0
521/21	≥ 64,0	≤ 1,0	≥ 64,0
660/21	≤ 1,0	≤ 1,0	1,0
834/21	32,0	≤ 1,0	≥ 32,0
838/21	≥ 64,0	≤ 1,0	≥ 64,0
846/21	32,0	4,0	8,0
ATCC	≤ 1,0	≤ 1,0	1,0
Среднее значение Mean			≥ 23,2 ± 5,0



---Δ--- МИК₁ (контроль) | MIC₁ (control)
 —◆— МИК₂ (опыт) | MIC₂ (experiment)

№ No.	МИК ₁ MIC ₁	МИК ₂ MIC ₂	МИК ₁ /МИК ₂ MIC ₁ /MIC ₂
185/21	4,0	≤ 0,25	≥ 16,0
199/21	4,0	≤ 0,25	≥ 16,0
291/21	4,0	≤ 0,25	≥ 16,0
313/21	4,0	≤ 0,25	≥ 16,0
521/21	4,0	≤ 0,25	≥ 16,0
660/21	4,0	≤ 0,25	≥ 16,0
834/21	4,0	≤ 0,25	≥ 16,0
838/21	8,0	≤ 0,25	≥ 16,0
846/21	4,0	1,0	4,0
ATCC	2,0	≤ 0,25	≥ 8,0
Среднее значение Mean			≥ 15,6 ± 3,9

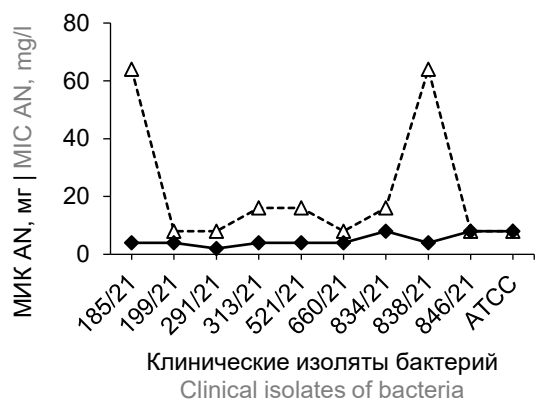


---Δ--- МИК₁ (контроль) | MIC₁ (control)
 —◆— МИК₂ (опыт) | MIC₂ (experiment)

№ No.	МИК ₁ MIC ₁	МИК ₂ MIC ₂	МИК ₁ /МИК ₂ MIC ₁ /MIC ₂
185/21	4,0	≤ 1,0	≥ 4,0
199/21	4,0	2,0	2,0
291/21	4,0	≤ 1,0	≥ 4,0
313/21	4,0	≤ 1,0	≥ 4,0
521/21	4,0	2,0	2,0
660/21	4,0	2,0	2,0
834/21	4,0	2,0	2,0
838/21	8,0	≤ 1,0	≥ 8,0
846/21	4,0	2,0	2,0
ATCC	2,0	2,0	1,0
Среднее значение Mean			≥ 3,1 ± 1,7

Рис. 2. Влияние повидон-йода на чувствительность клинических изолятов *K. pneumoniae* к цефепиму (FEP), ципрофлоксацину (CIP) и гентамицину (GM).

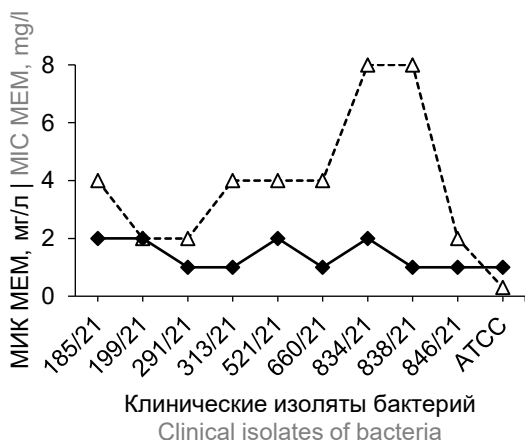
Fig. 2. The effect of povidone-iodine on the sensitivity of clinical isolates *K. pneumoniae* to cefepime (FEP), ciprofloxacin (CIP), and gentamicin (GM).



---△--- МИК₁ (контроль) | MIC₁ (control)
 —◆— МИК₂ (опыт) | MIC₂ (experiment)



---△--- МИК₁ (контроль) | MIC₁ (control)
 —◆— МИК₂ (опыт) | MIC₂ (experiment)



---△--- МИК₁ (контроль) | MIC₁ (control)
 —◆— МИК₂ (опыт) | MIC₂ (experiment)

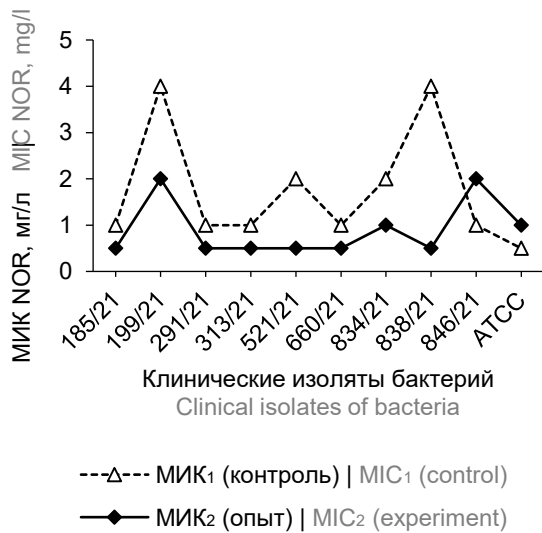
№ No.	МИК ₁ MIC ₁	МИК ₂ MIC ₂	МИК ₁ /МИК ₂ MIC ₁ /MIC ₂
185/21	≥ 64,0	4,0	≥ 16,0
199/21	8,0	4,0	2,0
291/21	8,0	≤ 2,0	≥ 4,0
313/21	16,0	4,0	4,0
521/21	16,0	4,0	4,0
660/21	8,0	4,0	2,0
834/21	16,0	8,0	2,0
838/21	≥ 64,0	4,0	≥ 16,0
846/21	8,0	8,0	1,0
ATCC	8,0	8,0	1,0
Среднее значение Mean			≥ 5,9 ± 2,2

№ No.	МИК ₁ MIC ₁	МИК ₂ MIC ₂	МИК ₁ /МИК ₂ MIC ₁ /MIC ₂
185/21	2,0	—	—
199/21	2,0	1,0	2,0
291/21	2,0	2,0	1,0
313/21	2,0	2,0	1,0
521/21	2,0	1,0	2,0
660/21	2,0	1,0	2,0
834/21	4,0	1,0	4,0
838/21	4,0	0,5	8,0
846/21	1,0	1,0	1,0
ATCC	1,0	1,0	1,0
Среднее значение Mean			2,4 ± 1,6

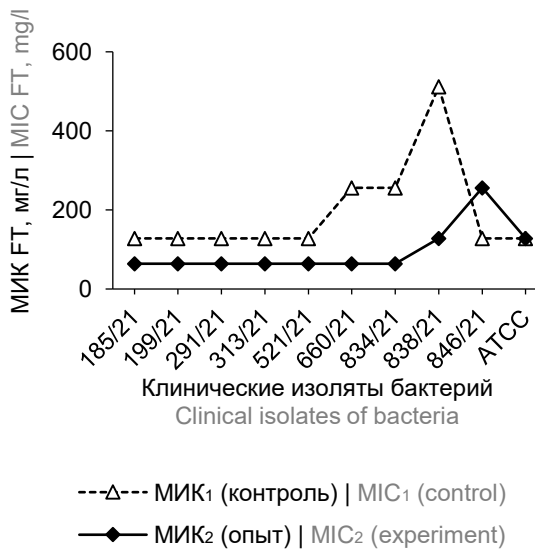
№ No.	МИК ₁ MIC ₁	МИК ₂ MIC ₂	МИК ₁ /МИК ₂ MIC ₁ /MIC ₂
185/21	4,0	2,0	2,0
199/21	2,0	2,0	1,0
291/21	2,0	1,0	2,0
313/21	4,0	1,0	4,0
521/21	4,0	2,0	2,0
660/21	4,0	1,0	4,0
834/21	8,0	2,0	4,0
838/21	8,0	1,0	8,0
846/21	2,0	1,0	2,0
ATCC	1,0	1,0	1,0
Среднее значение Mean			3,0 ± 1,8

Рис. 3. Влияние повидон-йода на чувствительность клинических изолятов *K. pneumoniae* к амикацину (AN), эртапенему (ETP) и меропенему (MEM).

Fig. 3. The effect of povidone-iodine on the sensitivity of clinical isolates *K. pneumoniae* to amikacin (AN), ertapenem (ETP), and meropenem (MEM).



№ No.	МИК ₁ MIC ₁	МИК ₂ MIC ₂	МИК ₁ /МИК ₂ MIC ₁ /MIC ₂
185/21	1,0	≤ 0,5	2,0
199/21	4,0	2,0	2,0
291/21	1,0	≤ 0,5	2,0
313/21	1,0	≤ 0,5	2,0
521/21	2,0	≤ 0,5	4,0
660/21	1,0	≤ 0,5	2,0
834/21	2,0	1,0	2,0
838/21	4,0	≤ 0,5	8,0
846/21	1,0	2,0	0,5
ATCC	0,5	1,0	0,5
Среднее значение Mean			2,5 ± 1,6



№ No.	МИК ₁ MIC ₁	МИК ₂ MIC ₂	МИК ₁ /МИК ₂ MIC ₁ /MIC ₂
185/21	128,0	64,0	2,0
199/21	128,0	64,0	2,0
291/21	128,0	64,0	2,0
313/21	128,0	64,0	2,0
521/21	128,0	64,0	2,0
660/21	256,0	64,0	4,0
834/21	256,0	64,0	4,0
838/21	512,0	128,0	4,0
846/21	128,0	256,0	0,5
ATCC	128,0	128,0	1,0
Среднее значение Mean			2,35 ± 1,5

Рис. 4. Влияние повидон-йода на чувствительность клинических изолятов *K. pneumoniae* к норфлоксацину (NOR) и нитрофурантоину (FT).

Fig. 4. Effect of povidone-iodine on the susceptibility of clinical isolates *K. pneumoniae* to norfloxacin (NOR) and nitrofurantoin (FT).

синтетическим полимерным поливинилпирролидоном (повидоном), повреждает клеточные стенки микроорганизмов за счёт окисления аминокислот, содержащих SH- и OH-группы. Также он окисляет бактериальные ферменты и трансмембранные белки, при этом изменяется их четвертичная структура и они теряют каталитическую и функциональную активность.

Представленные в работе результаты получены при выполнении научной темы по изучению влияния сублетальных концентраций биоцидов на формирование множественной устойчивости микроорганизмов к противомикробным средствам. В ходе исследований мы провели адаптацию клинических изолятов *K. pneumoniae* к 6 биоцидам (хлоргексидин, бензалконий хлорид, полигексаметиленгуанидин гидрохлорида, гликолевая кис-

лота, этанол и повидон-йод) с использованием метода адаптивной лабораторной эволюции [25] и установили, что только один изученный антисептик, а именно повидон-йод, приводил к повышению чувствительности изученных клинических изолятов к антибиотикам. Данные по влиянию хлоргексидина, бензалкония хлорида, полигексаметиленгуанидин гидрохлорида, гликолевой кислоты и этанола на селекцию устойчивости к антибиотикам отсутствуют в данной статье и будут опубликованы позже.

Достоверность полученных результатов может быть подтверждена тем, что представленные данные получены при одновременной постановке карт для контрольной ($n = 10$) и адаптированной ($n = 10$) групп микроорганизмов, в работе использовали одну партию карт, один автоматический анализатор,

Контрольный вариант Control variant	Антибиотик	МИК	Категори я	Антибиотик	МИК	Категори я
		БЛРС	ОТР.	-	Меропенем	2
	Ампициллин	>= 32	R	Амикацин	8	S
	Амоксициллин/клавулановая кислота	>= 32	R	Гентамицин	4	S
	Пиперациллин/тазобактам	>= 128	R	Ципрофлоксацин	0,5	S
	Цефотаксим	<= 1	*R	Норфлоксацин	4	S
	Цефтазидим	8	*R	Фосфомицин		
	Цефепим	<= 1	*R	Нитрофурантоин	128	R
	Эртапенем	2	*R	Триметоприм/сульфаметоксазол	<= 20	S
	Имипенем	2	*R			

Адаптированный вариант Adapted variant	Антибиотик	МИК	Категори я	Антибиотик	МИК	Категори я
		БЛРС	ПОЛ.	+	Меропенем	2
	Ампициллин	>= 32	R	Амикацин	4	S
	Амоксициллин/клавулановая кислота	16	*R	Гентамицин	2	S
	Пиперациллин/тазобактам	<= 4*	*R	Ципрофлоксацин	<= 0,25	S
	Цефотаксим	<= 1	*R	Норфлоксацин	2	S
	Цефтазидим	2	*R	Фосфомицин		
	Цефепим	<= 1	*R	Нитрофурантоин	64	I
	Эртапенем	1	*R	Триметоприм/сульфаметоксазол	<= 20	S
	Имипенем	2	*R			

Рис. 5. Лабораторные отчёты по определению чувствительности клинического изолята *K. pneumoniae* № 199/21 к антибиотикам (завершено 26.01.2022, тип карты: AST-№ 204, прибор, используемый для тестирования, — 00000A69B991 («VITEK 2C»)).

Fig. 5. Laboratory reports on the determination of the sensitivity of the clinical isolate *K. pneumoniae* № 199/21 to antibiotics (completed on 26.01.2022, card type: AST-№ 204, device used for testing 00000A69B991 ("VITEK 2C")).

один набор питательных сред и растворов. Исследования проводил один оператор.

Заключение

Нет данных, каким образом низкие концентрации повидон-йода могут стимулировать повышение чувствительности бактерий к антибиотикам, но, безусловно, этот феномен требует дальнейшего изучения и объяснения.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Le T., Wang L., Zeng C., et al. Clinical and microbiological characteristics of nosocomial, healthcare-associated, and community-acquired *Klebsiella pneumoniae* infections in Guangzhou, China. *Antimicrob. Resist. Infect. Control*. 2021;10(1):41. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13756-021-00910-1>
2. Zhang H., Guo Z., Chai Y., et al. Risk factors for and clinical outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* nosocomial infections: a retrospective study in a tertiary hospital in Beijing, China. *Infect. Drug. Resist.* 2021;14:1393–401. DOI: <https://doi.org/10.2147/IDR.S298530>
3. Durdu B., Hakyemez I.N., Bolukcu S., et al. Mortality markers in nosocomial *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection. *Springerplus*. 2016;5(1):1892. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3580-8>
4. Fräsera J.L., Mwatondo A., Alimi Y.H., et al. Healthcare-associated outbreaks of bacterial infections in Africa, 2009–2018: A review. *Int. J. Infect. Dis.* 2021;103:469–77. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.12.030>
5. Molton J.S., Tambyah P.A., Ang B.S., et al. The global spread of healthcare-associated multidrug-resistant bacteria: a perspective from Asia. *Clin. Infect. Dis.* 2013;56(9):1310–8. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/cit020>
6. Avershina E., Shapovalova V., Shipulin G. Fighting antibiotic resistance in hospital-acquired infections: current state and emerging technologies in disease prevention, diagnostics and therapy. review article. *Front. Microbiol.* 2021;12:707330. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.707330>
7. Cassini A., Hogberg L.D., Plachouras D., et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2019;19(1):56–66. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30605-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30605-4)
8. Ahmad M., Khan A.U. Global economic impact of antibiotic resistance: A review. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2019;19:313–6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.05.024>
9. Singer A.C., Shaw H., Rhodes V., Hart A. Review of antimicrobial resistance in the environment and its relevance to environmental regulators. *Front. Microbiol.* 2016;7:1728. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01728>
10. Zhang M., Wan K., Zeng J., et al. Co-selection and stability of bacterial antibiotic resistance by arsenic pollution accidents in source water. *Environ. Int.* 2020;135:105351. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105351>
11. Zhang Y., Gu A.Z., Cen T., et al. Sub-inhibitory concentrations of heavy metals facilitate the horizontal transfer of plasmid-mediated antibiotic resistance genes in water environment. *Environ. Pollut.* 2018;237:74–82. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.032>
12. Kampf G. Biocidal agents used for disinfection can enhance antibiotic resistance in gram-negative species. *Antibiotics (Basel)*. 2018;7(4):110. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics7040110>

13. Wand M.E., Bock L.J., Bonney L.C., Sutton J.M. Mechanisms of increased resistance to chlorhexidine and cross-resistance to colistin following exposure of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates to chlorhexidine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016; 61(1):e01162-16. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.01162-16>
14. Eggers M. Infectious disease management and control with povidone iodine. *Infect. Dis. Ther.* 2019;8(4):581–93. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40121-019-00260-x>
15. Kramer A., Dissemmond J., Kim S., et al. Consensus on wound antisepsis: update 2018. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2018; 31(1): 28–58. DOI: <https://doi.org/10.1159/000481545>
16. Grzybowski A., Kanclerz P., Myers W.G. The use of povidone-iodine in ophthalmology. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 2018;29(1): 19–32. DOI: <https://doi.org/10.1097/ICU.0000000000000437>
17. Williamson D.A., Carter G.P., Howden B.P. Current and emerging topical antibacterials and antiseptics: agents, action, and resistance patterns. *Clin. Microbiol. Rev.* 2017;30(3):827–60. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.00112-16>
18. Barreto R., Barrois B., Lambert J., et al. Addressing the challenges in antisepsis: focus on povidone iodine. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2020;56(3):106064. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106064>
19. Merchel Piovesan Pereira B., Wang X., Tagkopoulos I. Biocide-induced emergence of antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* 2021;12:640923. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.640923>
20. Barakat N.A., Rasmy S.A., Hosny A.E., Kashef M.T. Effect of povidone-iodine and propanol-based mectronium ethyl sulphate on antimicrobial resistance and virulence in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* 2022;11(1):139. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13756-022-01178-9>
21. Циркунова Ж.Ф., Емельянова А.А., Гудкова Е.И. и др. Влияние субингибирующих концентраций биоцидов на формирование адаптивной устойчивости клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*. *Иммунопатология, аллергология, инфектология.* 2022;(3):31–40. Tsirkunova Zh.F., Emel'yanova A.A., Gudkova E.I., et al. Effect of subinhibitory concentrations of biocides on formation of adaptive resistance of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Immunopathology, Allergology, Infectology.* 2022;(3):31–40. DOI: <https://doi.org/10.14427/jipai.2022.3.30> EDN: <https://www.elibrary.ru/ngcexg>
22. Jutkina J., Marathe N.P., Flach C.F., Larsson D.G.J. Antibiotics and common antibacterial biocides stimulate horizontal transfer of resistance at low concentrations. *Sci. Total Environ.* 2018;616-617:172–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.312>
23. Fraud S., Campigotto A.J., Chen Z., Poole K. MexCD-OprJ multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*: involvement in chlorhexidine resistance and induction by membrane-damaging agents dependent upon the AlgU stress response sigma factor. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008;52(12):4478–82. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.01072-08>
24. Di Cesare A., Fontaneto D., Doppelbauer J., Corno G. Fitness and recovery of bacterial communities and antibiotic resistance genes in urban wastewaters exposed to classical disinfection treatments. *Environ. Sci. Technol.* 2016;50(18):10153-61. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02268>
25. Mavrommatia M., Daskalakis A., Papanikolaou S., Aggelis G. Adaptive laboratory evolution principles and applications in industrial biotechnology. *Biotechnol. Advances.* 2022;54:107795. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107795>

Информация об авторах

Циркунова Жанна Федоровна[✉] — к.б.н., зав. лаб. внутрибольничных инфекций научно-исследовательской части Белорусского государственного медицинского университета, Минск, Республика Беларусь, tsyrunova@list.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2095-2378>

Емельянова Аlesia Александровна — м.н.с. лаб. внутрибольничных инфекций научно-исследовательской части Белорусского государственного медицинского университета, Минск, Республика Беларусь, <https://orcid.org/0000-0001-8354-6380>

Гудкова Елена Ивановна — к.м.н., доцент, руководитель научно-исследовательской части Белорусского государственного медицинского университета, Минск, Республика Беларусь, <https://orcid.org/0000-0002-4818-289X>

Скоруход Геннадий Алексеевич — к.м.н., доцент, ведущий сотрудник лаб. внутрибольничных инфекций научно-исследовательской части Белорусского государственного медицинского университета, Минск, Республика Беларусь, <https://orcid.org/0000-0002-7896-1413>

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 26.10.2022;
принята к публикации 12.02.2023;
опубликована 28.04.2023

Information about the authors

Zhanna F. Tsirkunova[✉] — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of nosocomial infections, Research unit, Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus, tsyrunova@list.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2095-2378>

Alesya A. Emel'yanova — junior researcher, Laboratory of nosocomial infections, Research unit, Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus, <https://orcid.org/0000-0001-8354-6380>

Elena I. Gudkova — Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Head, Research unit, Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus, <https://orcid.org/0000-0002-4818-289X>

Gennady A. Skorokhod — Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, leading researcher, Laboratory of nosocomial infections, Research unit, Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus, <https://orcid.org/0000-0002-7896-1413>

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 26.10.2022;
accepted for publication 12.02.2023;
published 28.04.2023

REVIEWS

Review

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-345>



The Russian database of HIV antiretroviral drug resistance

Dmitry E. Kireev[✉], Alina A. Kirichenko, Alexey E. Lopatukhin,
Anastasia V. Shlykova, Nikolai Yu. Galkin, Evgenii V. Saveler,
Maxim B. Glazov, Vadim V. Pokrovsky, Vasily G. Akimkin

Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia

Abstract

The development of sequencing technologies and bioinformatic analysis made it possible to conduct molecular and epidemiological studies, in which nucleotide sequences of the human immunodeficiency virus (HIV) are used as information added to the patient profile. From a practical perspective, studies of prevalence of HIV drug resistance (HIVDR) are of the highest significance. To promote such studies, different countries use databases that serve as repositories of genetic and epidemiological information. The Russian HIVDR database (<https://hivresist.ru/>) was created in 2009. Nevertheless, it was characterized by limited applicability for a long time. Since 2021, after the regulatory documents had been revised and updated, the entry of HIVDR research results into the Russian HIVDR database has been mandatory. Therefore, the priority attention has been given to upgrading the database and improving its functional capabilities. Different methods have been developed to enter clinical, epidemiological and genetic data. At the time of this study, the Russian database HIVDR contained 10,626 unique records about patients and 13,126 nucleotide sequences deposited by 10 institutions. The following functions have been provided for data analysis: quality control of the epidemiological and clinical information about a patient, quality control of nucleotide sequences, contamination check, subtyping, detection of DR mutations, identification of viral tropism and generation of standardized reports. The efforts toward further development of the Russian HIVDR database will be focused on designing tools for detection and analysis of molecular clusters, adaptation to routine application for epidemiological surveillance of HIV infection.

Keywords: *HIV, drug resistance, database, nucleotide sequence, quality control, subtyping, molecular clusters, molecular epidemiology*

Acknowledgements. The authors express their gratitude to Sergey Vladimirovich Shtrek, head of the laboratory at the Omsk Research Institute of Natural and Focal Infections of the Siberian Federal District Center for AIDS Prevention and Control; Natalia Nikolaevna Zaitseva, director, and Olga Yurievna Peksheva, head of the laboratory of molecular, genetic, and serological research methods at the Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology; Mikhail Valerievich Pitersky, head of the Ural District Center for AIDS Prevention and Control at the Ekaterinburg Research Institute of Viral Infections; Svetlana Vladimirovna Yaschenko, head of the laboratory of bacteriological, molecular, and genetic studies at the Krasnoyarsk Regional Center for AIDS Prevention and Control; Natalia Vladimirovna Filonyuk, head of the laboratory of clinical immunology at the Lipetsk Regional Center for Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases; Andrei Borisovich Shemshura, a doctor of clinical laboratory diagnostics at the Clinical Center for AIDS Prevention and Control at the Ministry of Health of the Krasnodar Territory; Dmitry Sergeevich Kolpakov, head of the clinical and diagnostic laboratory at the Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology; Marina Ridovna Bobkova, head of the laboratory of leukemia viruses at the Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Valeria Olegovna Kotova, head of the laboratory of epidemiology and prevention of viral hepatitis and AIDS at the Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology for depositing molecular, epidemiological and clinical information to the Russian HIVDR database.

Funding source. The study was funded through the inhouse grant of the Central Research Institute of Epidemiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотребнадзор) for the fundamental research "Development of the Russian HIV-1 antiretroviral drug resistance database".

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

For citation: Kireev D.E., Kirichenko A.A., Lopatukhin A.E., Shlykova A.V., Galkin N.Yu., Saveler E.V., Glazov M.B., Pokrovsky V.V., Akimkin V.G. The Russian database of HIV antiretroviral drug resistance. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2023;100(2):219–227. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-345> EDN: <https://www.elibrary.ru/maebdg>

Научный обзор

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-345>

Российская база данных устойчивости ВИЧ к антиретровирусным препаратам

Киреев Д.Е.[✉], Кириченко А.А., Лопатухин А.Э., Шлыкова А.В., Галкин Н.Ю., Савельер Е.В., Глазов М.Б., Покровский В.В., Акимкин В.Г.

Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Аннотация

Развитие технологий секвенирования и биоинформатического анализа дало возможность проведения молекулярно-эпидемиологических исследований, в которых нуклеотидные последовательности вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) используются в качестве дополнительной характеристики пациента. При этом наиболее значимым с практической точки зрения направлением работ является изучение распространения лекарственной устойчивости (ЛУ) ВИЧ. В различных странах для организации таких исследований применяются базы данных, являющиеся хранилищами генетической и эпидемиологической информации. Российская база данных устойчивости ВИЧ к антиретровирусным препаратам (<https://hivresist.ru/>) была создана в 2009 г. Тем не менее длительное время её применение оставалось ограниченным. С 2021 г. после обновления нормативных документов внесение результатов исследований ЛУ ВИЧ в российскую базу данных устойчивости ВИЧ к антиретровирусным препаратам стало обязательным. В связи с этим были проведены работы по усовершенствованию базы данных и увеличению её функциональных возможностей. Были разработаны различные способы внесения клиничко-эпидемиологических и генетических данных. На момент написания публикации российская база данных ЛУ ВИЧ содержала 10 626 уникальных записей о пациентах и 13 126 нуклеотидных последовательностей, загруженных 10 учреждениями. Для анализа данных были разработаны следующие функции: контроль качества эпидемиологической и клинической информации о пациенте, контроль качества нуклеотидных последовательностей, проверка на контаминацию, субтипирование, выявление мутаций ЛУ, определение вирусного тропизма и генерация стандартизированных отчётов. В планах по дальнейшему развитию российской базы данных ЛУ ВИЧ — разработка инструмента для выявления и анализа молекулярных кластеров и адаптация для рутинного использования в рамках эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией.

Ключевые слова: ВИЧ, лекарственная устойчивость, база данных, нуклеотидная последовательность, контроль качества, субтипирование, молекулярные кластеры, молекулярная эпидемиология

Благодарности. Авторы выражают благодарность Сергею Владимировичу Штреку, заведующему лабораторией Омского НИИ природно-очаговых инфекций Сибирского федерального окружного центра по профилактике и борьбе со СПИД; Наталье Николаевне Зайцевой, директору, и Ольге Юрьевне Пекшевой, заведующей лабораторией молекулярно-генетических и серологических методов исследования Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной; Михаилу Валерьевичу Питерскому, руководителю Уральского окружного центра по профилактике и борьбе со СПИД Екатеринбургского НИИ вирусных инфекций; Светлане Владимировне Яценко, заведующей лабораторией бактериологических и молекулярно-генетических исследований Красноярского краевого центра профилактики и борьбы со СПИД; Наталье Владимировне Филонюк, заведующей клиничко-иммунологической лабораторией Липецкого областного центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями; Андрею Борисовичу Шемшуре, врачу клинической лабораторной диагностики Клинического центра профилактики и борьбы со СПИД Министерства здравоохранения Краснодарского края; Дмитрию Сергеевичу Колпакову, заведующему клиничко-диагностической лабораторией Ростовского НИИ микробиологии и паразитологии; Марине Ридовне Бобковой, заведующей лабораторией вирусов лейкозов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи; Валерии Олеговне Котовой, заведующей лабораторией эпидемиологии и профилактики вирусных гепатитов и СПИДа Хабаровского НИИ эпидемиологии и микробиологии за внесение молекулярной, эпидемиологической и клинической информации в Российскую базу данных устойчивости ВИЧ к антиретровирусным препаратам.

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках внутреннего гранта ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора на фундаментальное исследование «Развитие Российской базы данных лекарственной устойчивости ВИЧ-1 к антиретровирусным препаратам».

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

Для цитирования: Киреев Д.Е., Кириченко А.А., Лопатухин А.Э., Шлыкова А.В., Галкин Н.Ю., Савельер Е.В., Глазов М.Б., Покровский В.В., Акимкин В.Г. Российская база данных устойчивости ВИЧ к антиретровирусным препаратам. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100:online-first. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-345> EDN: <https://www.elibrary.ru/maebdg>

Introduction

Molecular and genetic technologies have become indispensable tools in diagnosis, epidemiology, and treatment of infectious diseases. For more than 20 years, methods of identification of nucleotide sequences (NS) of the human immunodeficiency virus (HIV) have been used for detecting drug resistance (DR) of the virus and subsequent assessment of effectiveness of antiretrovirals (ARVs). With the growing number of existing drugs and patients receiving antiretroviral therapy (ART), the significance of the analysis and the number of related studies are increasing. In the meantime, the intermediate results of virus DR studies, namely NS, can also be used in epidemiology to study patterns of the virus spread. In this case, information about the virus can be seen as an additional parameter, which is analyzed together with epidemiological, clinical, and demographic characteristics of a HIV-infected individual. Being an objective parameter, NS are especially useful in studies of diseases difficult to diagnose, chronic, and associated with a high level of stigma.

Therefore, storage of molecular data and related information about a patient, including their further analysis, is an important aspect of the research on epidemiology of HIV infection. There are continuously expanded national and regional HIV NS databases. The most complete national databases in Switzerland [1] and the United Kingdom [2] contain information about more than 50% of HIV-infected residents of these countries. Genetic data on the virus are added to these databases mainly through HIVDR studies performed during routine healthcare delivery to HIV-infected individuals.

The growth rate of the HIV infection epidemic in Russia is much higher than the respective rates in developed countries. In 2021, the reported incidence rate was 48.7 per 100,000 population, while the prevalence rate was 782.0 per 100,000 population. At the end of 2021, there were 1,137,596 people living with HIV in Russia and more than 660,000 people took ARVs. In the meantime, every year, more than 15% of patients taking ARVs do not reach an undetectable viral load¹. According to the standard healthcare requirement, HIV drug resistance tests should be available to each tenth patient with HIV two times a year².

Considering the scale of the epidemic and the requirements of the regulatory documents, Russia needs more than 100,000 HIVDR-related tests annually.

However, due to high costs, labor inputs, and insufficient equipment of laboratories at centers for prevention and control of AIDS and infectious diseases (AIDS centers), the actual number of tests is less than 10%. In 2020 and 2021, the total number of reagent kits purchased for HIVDR tests was 7,438 and 7,232, respectively³. Therefore, due to the objective reasons, with the same financial support provided to the AIDS centers and the same sequencing technologies used in Russia, the required coverage of HIV-positive individuals by DR tests will not be reached. In addition, the results of the existing few HIV drug resistance tests are often unavailable for further epidemiological studies due to the absence of the tool for collection, storage, and analysis of the information.

To minimize losses of virus-related genetic data and to monitor HIVDR, the Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor created a Russian database of HIV resistance to ARVs (RDB; <https://www.hivresist.ru/>). The use of RDB was first governed by the methodological guidelines of 2013⁴ and then by the methodological instructions of 2016.⁵ Starting from 2021, in accordance with the revised Sanitary Regulations and Standards 3.3686-21⁶, all AIDS centers have to deposit NS obtained during HIVDR tests and the related depersonalized information about patients to RDB.

Acquisition of genetic information about the virus and its subsequent bioinformatic analysis can improve the effectiveness of epidemiological surveillance of HIV infection, improve the quality of healthcare delivery and, eventually, contribute to reduction in new cases. The advanced analysis techniques have entailed improvement of RDB.

The **purpose** of the article was to describe the functional capabilities of the Russian HIV antiviral drug resistance database with reference to the NS analysis and related information about patients.

Programming languages and bioinformatic methods

The internal part of RDB is accessible only to registered users and is supported by PHP, JS, HTML, CSS languages. The external part is accessible to any

¹ HIV infection in the Russian Federation as of 31/12/2021. AIDS Prevention and Control Report of the Central Research Institute of Epidemiology, Rospotrebnadzor. URL: <http://www.hivrusia.info/wp-content/uploads/2022/03/Spravka-VICH-v-Rossii-na-31.12.2021-g.pdf>

² Decree No. 438n of the Ministry of Health of the Russian Federation, 23/6/2022, On Approval of the Standard for the Primary Healthcare for Adults with HIV Infection (Diagnostics, Treatment, and Follow-Up Monitoring).

³ The International Treatment Preparedness Coalition, Eastern Europe, and Central Asia. Analysis of Purchases of Diagnostic Tools for HIV Treatment in Russia in 2020–2021. 2022. URL: <https://itpc-ecca.org/wp-content/uploads/2022/07/monitoring-testov-vich-2020-21-gg-1.pdf>

⁴ Methodological guidelines "Monitoring of the Spread of HIV Strains Resistant to Antiviral Drugs". Moscow, 2013.

⁵ Epidemiological Surveillance of HIV infection. Methodological instructions. Moscow, 2016.

⁶ Resolution No. 4 of the Chief Public Health Officer of the Russian Federation, 28/1/2021, On Approval of Sanitary Regulations and Standards 3.3686-21 "Sanitary and Epidemiological Requirements for Prevention of Infectious Diseases" (as amended on May 25, 2022)".

user of the Internet and operates on the Bitrix platform.

The statistics is updated automatically at the specified time intervals. The data for the home page are acquired through API (Application Programming Interface) in the json format. Charts displayed on the home page of the website are built using the ChartJS library.

The analysis of NS for identification of subtypes, for the presence of resistance mutations and DR to ARVs was performed using resources of the database of the Stanford University (<https://hivdb.stanford.edu/>).

The assessment of NS encoding the V3 loop for viral tropism was performed using the resource of the Max Planck Institute for Informatics (<https://coreceptor.geno2pheno.org/>).

The uploaded NS were screened for contamination using the BLAST (Basic Local Alignment Search) tool. The threshold was set at the 98% and 99% levels of absolute and relative genetic similarity between NS.

Entry of information into the database

There are two options for uploading information. In the first option, information is entered manually for each patient. This option is recommended when data are added to the database regularly.

Different methods of filling fields in a patient card are offered to make information entry easier. The first method includes a drop-down list and a selection of the offered options, thus eliminating the risk of errors associated with manual entry. It is backed up by directories containing information about cities/towns/localities, ARVs, codes related to causes of HIV infection and HIV testing. The second method is used for automatic selection of the region of residence and federal district when the city of residence is entered. The third method is used for selection of multiple ARVs. All methods have prompts and filters. The filters offer the selection between the full and short name of an ARV from the drop-down list.

Any changeable variables such as HIV RNA levels or CD4 cell counts can be added to the patient card at any time. The accuracy of records is constantly monitored; for example, the initial treatment date cannot be later than the date of its completion. All the detected errors are highlighted with red color to be noticeable to the user. Autofill and flash fill features are provided. If any changes in the existing lists are required, including addition of new ARVs, the directories can be amended by RDB administrators.

The second option is used when data on multiple patients must be entered to a spreadsheet that is uploaded to the database. The spreadsheet template can be downloaded by any user and is available in the user account in RDB.

At any time, users can go back to the already added patients to update the information or add new data.

Quality control of information entered into the database

Quality control of epidemiological and clinical information about patients in uploaded spreadsheets

When using spreadsheets for bulk upload, the database provides the following screening features:

- screening for accuracy of filling the template;
- screening for identical reference numbers of patient cards;
- matching the reference numbers of new patient cards against the numbers existing in RDB;
- verification of the new information about the patient against the existing data.

In all cases, if any duplicate is detected, when uploading records of the patient, whose data exist in RDB, the system asks the user to confirm that the new information does not contain any errors, and after the confirmation is received, the new information is added to the existing records. The system searches for duplicate entries by matching reference numbers of cards and by the matching combination of the patient's date of birth, the date of their first positive immunoblot, and the patient's sex.

Quality control of nucleotide sequences

To evaluate the quality of new NS, we have developed an algorithm with the following parameters: the number of the first amino acid coded by NS; the number of the last amino acid coded by NS; the number of reading frame shifts, insertions/deletions, stop codons, degenerate positions, APOBEC, and atypical mutations. New NS are analyzed using the offered algorithm and, if any NS of inadequate quality is detected, are marked by respective flags. The user is offered several options: To delete the flagged NS from the pool intended for upload or to edit and upload the edited NS or to upload NS as they are, without any changes. To prevent any errors in the results of subsequent analyses when they fail the quality control, NS are marked as controversial and are not used in further data analysis and generation of standardized reports.

Contamination screening

To detect any contamination of specimens, which may have occurred during the test, we have developed a program to measure the genetic similarity of the new NS uploaded to RDB. After the fasta file with the new and existing NS is converted into a binary format, genetic similarity is measured for different NS groups (within one group uploaded to the database at the same time; within the group uploaded to the database in the last 3 months; within all NS uploaded by a specific institution). If any abnormally high genetic similarity between the analyzed NS has been identified, the program

marks these NS and notifies the user about possible contamination.

Analysis of entered information, export of data and generation of reports

Analysis of nucleotide sequences

The automated NS analysis is performed using specially developed tools. At present, functional capabilities RDB are implemented through the most practically important set of tools for genetic data analysis. The analysis is performed when HIV NS are uploaded to RDB.

Genetic variants are identified using the algorithm of the Stanford University. RDB exports NS to the university website and then retrieves the information about the specified genetic variants.

NS are assessed for presence of ARV resistance mutations using the Stanford database. The sequence is exported for the remote analysis and then the results of analysis are imported, including automatic translation into Russian language. Upon the completion of the analysis, the HIVDR information is stored in the patient's individual card and can be exported as an Excel spreadsheet or *.pdf file.

Viral tropism assessment is performed in RDB when NS of the HIV gp120 envelope protein V3 loop region are uploaded. The assessment is performed using the geno2pheno algorithm developed at the Max Planck Institute for Informatics [3]. Then the information about viral tropism is added to the patient's individual card.

Data download and report generation

Download functions are available both for all the existing data and for part of the uploaded information. Filters with main parameters can be used for downloaded information, including the date of upload, the date of blood collection, the date of diagnosis, the history of ARV taking, etc. In addition, patient cards can be downloaded in the *.pdf format.

The additional feature includes generation of a standardized report based on the analysis of uploaded data. The system collects the required data in RDB, analyzes these data and generates a standardized annual report. The report contains text fields, which users can edit and update when required; it also has tables containing data on patients and on prevalence of HIVDR mutations in the region. The report also includes statistical data on the sex of patients, the infection routes, HIVDR. Generated reports can be stored for further use or downloaded in the *.pdf format. In addition, users can download statistical graphs to use them in their reports or presentations.

Number of users and amount of uploaded data

On 1/7/2022, a total of 10 users were registered in RDB. The total number of unique records about patients was 10,626 and the total number of NS was 13,126. The numbers of records about patients and NS uploaded by registered users are shown in **Table 1**.

Since molecular and epidemiological studies require clinical and epidemiological information, special attention was given to acquisition of data on the patient's sex, age, region of residence, presumed route of

Table 1. Information about users of the Russian HIV-1 antiviral drug resistance database and the amount of uploaded information

Institution	Number of patients (records)	Number of sequences (genome region)				
		pro-rev	int	pro-rev-int	env	full
Siberian Federal District Center for the Prevention and Control of AIDS, Omsk Research Institute of Natural Focal Infections	1548	1548	0	0	0	0
Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after academician I.N. Blokhina	82	82	0	0	0	0
Yekaterinburg Research Institute of Viral Infections	265	275	0	0	0	0
Krasnoyarsk Regional Center for Prevention and Control of AIDS	62	62	0	0	0	0
Lipetsk Regional Center for the Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases	57	57	0	0	0	0
Clinical Center for the Prevention and Control of AIDS of the Ministry of Health of the Krasnodar Territory	10	10	0	0	0	0
Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology	175	175	0	0	0	0
N.F. Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology	3544	3544	24	0	93	0
Central Research Institute for Epidemiology	4801	4729	899	293	857	396
Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology	82	82	0	0	0	0
Total	10 626	10 564	923	293	950	396

Note. Pro-rev — protease gene NS and 2/3 reverse transcriptase gene NS; int — integrase gene NS; pro-rev-int — protease, reverse transcriptase and integrase gene NS; env — gp120 V3 loop protein NS; full — NS of the entire coding region of HIV genome.

Table 2. Completeness of clinical and epidemiological information in patient records available in RDB

Patient profile		Patient records	
		<i>n</i>	%
Sex	available	10 490	98,7
	no data	136	1,3
Year of birth	available	10 281	96,8
	no data	345	3,2
Year of the first positive immunoblot	available	10 344	97,3
	no data	282	2,7
Alleged route of infection	available	7998	75,3
	no data	2628	24,7
Information about ARV treatment history	available	10 295	96,9
	no data	331	3,1
Region of residence	available	10 143	95,5
	no data	483	4,5
Information about ART regimens	available	4342	81,2
	no data	1005	18,8

infection, and the date of diagnosis as well as the patient's history of taking ARVs and administered ART regimens. Information about such data is shown in **Table 2**.

Copyright and data exchange between users

Any institution that has its user account has an access to all the above mentioned tools of the database and the information uploaded by employees of the institution. The information uploaded by employees of other institutions can also be accessible, provided that the institution has granted access. Thus, on the one hand, RDB ensures confidentiality of the uploaded information. On the other hand, it offers the possibility of fast exchange and joint analysis of collective data when several institutions perform joint scientific and clinical studies.

Conclusion

Collection and storage of genetic information about the pathogen and the related information about patients are of exceptional importance, and at the present stage, the centralized analysis of these data is instrumental in addressing epidemiological issues. For example, the Virus Genome Aggregator of Russia (VGARus) [4], which was created during the COVID-19 pandemic, has demonstrated its indispensability in monitoring of emerging viral variants and in the assessment of their contagiousness.

For HIV infection, there are respective databases, which are used for different purposes. Some researchers use them to analyze general trends of epidemic development [5, 6]; others use them for decisions on epidemic control measures [7]. The most popular HIV

infection research areas in Russia, where the database can be of high benefit, include DR studies [8] and the analysis of spread patterns of different genetic variants of the virus [9].

The most important characteristics of any database are the amount of information, which it contains, and functions addressing the specific tasks. They are especially important for performance of molecular and epidemiological studies, as the absence of the required analysis tools turns the database into an ordinary repository, making it similar to spreadsheets, while the small amount of information significantly affects the reliability of research results.

The requirement for uploading HIV NS and the related information about patients to the Russian HIV antiviral drug resistance database in compliance with the Sanitary Regulations and Standards 3.3686-21 offers promising prospects that the amount of uploaded information will increase in future. For this reason, one of the priority tasks is to improve functional capabilities of RDB. Due to the modifications that facilitated the speed and easiness of uploading information, the number of records entered into RDB has significantly increased in the last years. By 1/11/2022, the number of the most important protease and reverse transcriptase gene sequences had increased to more than 10,000. They outnumber the publicly available Russian HIV sequences deposited to the Global HIV Database of the Los Alamos National Laboratory (<https://hiv.lanl.gov>). Currently, it contains a total of 8,875 sequences deposited from Russia. It should be noted that in RDB, each entry is provided with a much larger amount of epidemiological and clinical information. In the Global HIV Database, the information about some important details such as the date of diagnosis, the region of

residence and ART regimens is absent, while in other databases, the information about the presumed route of transmission (54.2%), the patient's sex (43.9%), and age (16.9%) is missing in many records.

The user-friendly method offered in RDB for entering patients' characteristics helped increase the amount of collected information; the data on the sex, age, date of diagnosis, presumed route of infection, region of residence, and history of ARV taking are filled at 93.4%. Thus, according to the Rospotrebnadzor data on HIV infection in Russia as of 31/12/2021, the percentage of HIV-infected Russian citizens with known HIV NS is 0.66% of the total number of detected cases of infection (1,562,570 cases) and 0.90% of the number of individuals living with HIV (1,137,596 people).

In addition to the increased number of records in RDB, the quality of uploaded information has improved significantly. The automated quality control decreases the risk of errors in clinical and epidemiological characteristics of patients; it also minimizes the risk of uploading false data regarding NS. We have found that up to 5% of the uploaded NS are identical to each other, demonstrating the discrepancy with the epidemiological data of patients. This situation can take place either due to errors during copying and entering data about patients or due to contamination. Here, contamination is defined as contamination of one clinical specimen by another specimen during the test at a laboratory. Regardless of the reason for present of identical HIV NS in different patients, such error can have a disastrous effect. Patients will receive the results of the DR ana-

lysis for the virus they are not infected with. The newly developed contamination screening tool eliminates any risk of such errors [10].

Other important, newly added features include automated subtyping, detection of DR mutations and identification of viral tropism. For example, DR data can be used not only at the individual, but also at the population level. Information about the DR structure and prevalence can be used in choosing ART regimens based on national recommendations or in decisions on purchasing of ARVs.

Our further plans include development of a more complex and advanced tool for bioinformatic analysis. Detection of molecular clusters is essential for studies in molecular epidemiology [11, 12]. This function will be available to RDB users in the near future.

Upgrading and updating of RDB will help improve the security of virus-related genetic information obtained from HIVDR tests in Russia and increase the quality of studies in molecular epidemiology of HIV infection. The increased number of tests and continuous expansion of RDB through adding new information will expedite its use in the routine epidemiological practice. The detected molecular clusters will help healthcare specialists identify vulnerable groups and administrative districts characterized by rapid virus transmission, thus contributing to enhancing the effectiveness of epidemic control measures. Thus, in the foreseeable future, RDB can change its status of a solely scientific tool and become a significant component of the epidemiological surveillance.

REFERENCES

1. Scherrer A.U., Traytel A., Braun D.L., et al. Cohort profile update: The Swiss HIV Cohort Study (SHCS). *Int. J. Epidemiol.* 2022;51(1):33–4j. DOI: <https://doi.org/10.1093/ije/dyab141>
2. Dunn D., Pillay D. UK HIV drug resistance database: background and recent outputs. *J. HIV Ther.* 2007;12(4):97–8.
3. Lengauer T., Sander O., Sierra S. et al. Bioinformatics prediction of HIV coreceptor usage. *Nat. Biotechnol.* 2007;25(12):1407–10. DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt1371>
4. Akimkin V.G., Semenenko T.A., Ugleva S.V., et al. COVID-19 in Russia: epidemiology and molecular genetic monitoring. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk.* 2022;77(4):254–60. DOI: <https://doi.org/10.15690/vramn2121>
5. Kusejko K., Salazar-Vizcaya L., Shah C., et al. Sustained effect on hepatitis c elimination among men who have sex with men in the Swiss HIV cohort study: a systematic re-screening for hepatitis C RNA two years following a nation-wide elimination program. *Clin. Infect. Dis.* 2022;75(10):1723–31. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciac273>
6. Kusejko K., Marzel A., Nguyen H., et al. Differences in social and mental well-being of long-term survivors among people who inject drugs and other participants in the Swiss HIV Cohort Study: 1980–2018. *Antivir. Ther.* 2020;25(1):43–54. DOI: <https://doi.org/10.3851/IMP3347>
7. Poon A.F., Gustafson R., Daly P., et al. Near real-time monitoring of HIV transmission hotspots from routine HIV genotyping: an implementation case study. *Lancet HIV.* 2016;3(5):e231–8. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2352-3018\(16\)00046-1](https://doi.org/10.1016/S2352-3018(16)00046-1)
8. Ebbert M.T., Mallory M.A., Wilson A.R., et al. Application of a new informatics tool for contamination screening in the HIV sequencing laboratory. *J. Clin. Virol.* 2013;57(3):249–53. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.03.013>
9. Hassan A.S., Pybus O.G., Sanders E.J., Albert J., Esbjörnsson J. Defining HIV-1 transmission clusters based on sequence data. *AIDS.* 2017;31(9):1211–22. DOI: <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001470>
10. Kosakovsky Pond S.L., Weaver S., et al. HIV-TRACE (TRANsmiission Cluster Engine): a tool for large scale molecular epidemiology of HIV-1 and other rapidly evolving pathogens. *Mol. Biol. Evol.* 2018;35(7):1812–9. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msy016>

Информация об авторах

Киреев Дмитрий Евгеньевич[✉] — к.б.н., зав. лаб. диагностики и молекулярной эпидемиологии ВИЧ-инфекции ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, dmitkireev@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7896-2379>

Кириченко Алина Алексеевна — н.с. лаб. диагностики и молекулярной эпидемиологии ВИЧ-инфекции ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7116-0138>

Лопатухин Алексей Эдуардович — н.с. лаб. диагностики и молекулярной эпидемиологии ВИЧ-инфекции ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2826-699X>

Шлыкova Анастасия Вениаминовна — н.с. лаб. диагностики и молекулярной эпидемиологии ВИЧ-инфекции ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1390-8021>

Галкин Николай Юрьевич — старший программист информационных систем центра по развитию информационных технологий и систем ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2144-8774>

Савельев Евгений Викторович — руководитель группы разработки информационных систем центра по развитию информационных технологий и систем ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2811-8097>

Глазов Максим Борисович — руководитель центра по развитию информационных технологий и систем ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2195-1580>

Покровский Вадим Валентинович — д.м.н., профессор, академик РАН, зав. специализированным отделом по эпидемиологии и профилактике СПИДа ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9514-7288>

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

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

Статья поступила в редакцию 24.11.2022;
принята к публикации 01.02.2023;
опубликована 28.03.2023

Information about the authors

Dmitry E. Kireev[✉] — Cand. Sci. (Biol.), Head, HIV diagnostic and molecular epidemiology laboratory, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, dmitkireev@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7896-2379>

Alina A. Kirichenko — researcher, HIV diagnostic and molecular epidemiology laboratory, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7116-0138>

Alexey E. Lopatukhin — researcher, HIV diagnostic and molecular epidemiology laboratory, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2826-699X>

Anastasia V. Shlykova — researcher, HIV diagnostic and molecular epidemiology laboratory, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1390-8021>

Nikolai Yu. Galkin — senior programmer, Center for the development of information technologies and systems, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2144-8774>

Evgenii V. Saveler — Group Head, Center for the development of information technologies and systems, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2811-8097>

Maxim B. Glazov — Head, Center for the development of information technologies and systems, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2195-1580>

Vadim V. Pokrovsky — D. Sci. (Med.), Prof., Full Member of RAS, Head, HIV department, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9514-7288>

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

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

The article was submitted 24.11.2022;
accepted for publication 01.02.2023;
published 28.03.2023

Научный обзор

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-113>

Иммуногенез при лихорадке Ласса и перспективы разработки вакцины

Маркин В.А.

48 Центральный научно-исследовательский институт, Сергиев Посад-6, Россия

Аннотация

В 2017 г. ВОЗ включила лихорадку Ласса в перечень приоритетных патогенов для разработки вакцин и объявила чрезвычайную ситуацию в области общественного здравоохранения по вызываемой им инфекции.

Анализ данных литературы по строению генома вируса Ласса и его штаммовому многообразию показал, что молекулярная гетерогенность штаммов существенна при конструировании вакцин и оценке их эффективности, что определено соответствующими рекомендациями ВОЗ. При репродукции вирус Ласса противодействует клеточному иммуногенезу — подавляет экспрессию супрессора сигнальных белков, цитокинов и рецептора RLR, распознающего вирусную двухсегментную РНК.

Белок GP, определяющий инфекционность возбудителя и тропизм, должен быть основной мишенью для разрабатываемых вакцин. Другие мишени — процессы синтеза вирусной РНК, определяющие особенности иммуногенеза. Исследование иммуногенеза лихорадки Ласса показывает, что предпочтительным кандидатом была бы реплицирующаяся апаатогенная вакцина, способная индуцировать оптимальное сочетание клеточных и гуморальных ответов, т.е. вызывающая высокую активность Т-лимфоцитов и выработку вируснейтрализующих антител. Одной из важнейших характеристик живой кандидатной вакцины должна быть генетическая стабильность для исключения реверсии в направлении к более патогенному генотипу. Из сконструированных более 130 кандидатных вакцин против лихорадки Ласса лишь две (рекомбинант на платформе вируса кори и ДНК-вакцина) как наиболее перспективные испытаны на иммуногенность и безвредность для людей. Для дальнейшей разработки перспективны рекомбинант вируса Ласса с вирусом везикулярного стоматита и реассортанты вирусов Мопейя (MOPV/LASV — ML29) и Ласса (r3ML29). Перспективна кандидатная вакцина rVSVΔG/LVGPC, аналогичная по конструкции вакцине rVSVΔG-ZEBOV-GP против лихорадки Эбола.

Ключевые слова: вакцина, иммуногенез, клеточный патогенез, лихорадка Ласса, обзор

Источник финансирования. Автор заявляет об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Маркин В.А. Иммуногенез при лихорадке Ласса и перспективы разработки вакцины. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(2):228–239. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-113> EDN: <https://www.elibrary.ru/nyoqeh>

Review

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-113>

Immunogenesis in Lassa fever and prospects for vaccine development

Vladimir A. Markin

48 Central Research Institute, Sergiev Posad-6, Russia

Abstract

Analysis of literature data on the structure of the Lassa virus genome and its strain diversity has shown that the molecular heterogeneity of strains is essential in the design of vaccines and evaluation of their efficacy, which is

determined by the relevant WHO recommendations. During virus reproduction, Lassa counteracts cellular immunogenesis by suppressing the expression of the suppressor of signaling proteins, cytokines and the RLR receptor that recognizes viral two-segmented RNA.

The GP protein, which determines the pathogen's infectivity and tropism, should be the main target for vaccines being developed. Other targets are the processes of viral RNA synthesis that determine the features of immunogenesis. A study of the immunogenesis of Lassa fever shows that the preferred candidate would be a replicating apathogenic vaccine capable of inducing an optimal combination of cellular and humoral responses, that is, causing high activity of T-lymphocytes and the production of viral neutralizing antibodies. One of the most important characteristics of a live candidate vaccine should be genetic stability to exclude reversion to a more pathogenic genotype.

Of the more than 130 candidate vaccines against Lassa fever designed, only two being the most promising were tested for immunogenicity and safety in humans (a recombinant on the measles virus platform and a DNA vaccine). A recombinant of Lassa virus with vesicular stomatitis virus and reassortants of Mopeya and Lassa viruses (MOPV/LASV- ML29) and (r3ML29) are promising for further development. A candidate vaccine rVSVΔG/LVGPC, similar in design to the rVSVΔG-ZEBOV-GP vaccine against Ebola, is promising.

Keywords: vaccine, immunogenesis, cellular pathogenesis, Lassa fever, review

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

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

For citation: Markin V.A. Immunogenesis in Lassa fever and prospects for vaccine development. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2023;100(2):228–239. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-113> EDN: <https://www.elibrary.ru/nyoqeh>

Лихорадка Ласса (ЛЛ) — особо опасный зооноз, протекающий у людей с геморрагическим синдромом, полиорганной недостаточностью, гиповолемическим шоком, заканчивающийся у 50% госпитализированных смертью. Возбудитель ЛЛ — вирус Ласса (ВЛ), относящийся к микроорганизмам I группы патогенности.

Этиологический агент эндемичен в государствах Западной Африки: Сьерра-Леоне, Гвинея, Нигерии, Либерии, Кот-д'Ивуаре, Того, Бенине и Гане с населением в группе риска до 200 млн человек [1]. Считают, что ежегодно ВЛ заражаются от 3 до 5 млн человек, из которых приблизительно у 100 000–300 000 развиваются клинически выраженные формы инфекции [2, 3], умирают 5–67 тыс. человек [4–6] при общей летальности 0,9%, а среди госпитализированных — 18%. Во вспышке 2015 г. в Нигерии при выраженных случаях летальность достигала 50% [2]; в 2019–2020 гг. летальность снизилась до 22,7% среди госпитализированных [7]. Инфекция контагиозна [2]. У 8,8% больных развивается делирий [8]. Распространённость антител к возбудителю в Сьерра-Леоне составляет 8–52% населения, в Гвинея — 4–55%, в Нигерии — 21% [9]. Эффективных против ЛЛ этиотропных препаратов до настоящего времени не разработано [10]. Плазма реконвалесцентов в качестве препарата для терапии при ЛЛ неэффективна [11].

Описаны 33 случая заноса возбудителя с больными людьми в Европу, Северную Америку и Азию, иногда заканчивавшихся гибелью пациентов и заражениями медицинского персонала [12, 13]; проникновения ВЛ в Россию не выявлено, однако потоки

мигрантов, туристов, студентов и др. могут привести к заносу инфекции в нашу страну. В 2017 г. ВОЗ включила ВЛ в перечень приоритетных патогенов для разработки вакцин¹, а с 2018 г. объявила чрезвычайную ситуацию в области общественного здравоохранения по вызываемой им инфекции [1, 14]. Эти факты определяют актуальность разработки вакцин против ЛЛ.

Цель настоящего обзора — анализ данных литературы по систематике ВЛ, его структуре, генетическим особенностям, штаммовом разнообразии, данных о патогенезе на клеточном уровне и иммуногенезе инфекции, направлениях разработки кандидатных вакцин против ЛЛ.

Разработка современных защитных иммунобиологических препаратов против конкретных возбудителей основывается на сведениях об их генетических особенностях, штаммовом разнообразии с присущей вариабельностью генома и антигенной структуры, данных о патогенезе на клеточном уровне и иммуногенезе инфекции.

ВЛ является членом семейства *Arenaviridae*, род *Mammarenavirus*, категоризованный как аренавирус Старого Света [1, 15]. Эта группа включает вирусы лимфоцитарного хореоменингита (ЛХМ), Мобала, Мопейя и др. [16]. Возбудитель был первоначально выделен в 1969 г. в Нигерии (штамм LP линии I штаммов возбудителя) [1], а позже — во многих странах Западной Африки.

¹ WHO. WHO target product profile for Lassa virus vaccine; 2017. URL: <https://www.who.int/publications/m/item/who-target-product-profile-for-lassa-virus-vaccine>

Геном и функции белков

Геном ВЛ (рис. 1) состоит из двухсегментированной (–) РНК. Большой сегмент (L) имеет размер приблизительно 7,2 килобазы и кодирует для вирусной РНК дополнительную РНК-полимеразу (RdRp), РНК-зависимую РНК-полимеразу (L) и многофункциональный матричный цинксвязывающий белок Z. Малый сегмент генома (S) размером приблизительно 3,4 килобазы кодирует вирусный нуклеопротеин (NP) и гликопротеиновый комплекс (GPC) [3, 18]. Полимераза L содержит 4 предполагаемых домена. Домен 1 функционирует как эндонуклеаза, остальные области не идентифицированы в плане энзиматической или регулирующей активности. Матричный белок Z содержит три домена: N, RING и C. Домен N связывается с клеточной плазматической мембраной. Домен RING, хелатно связывающий ионы Zn^{2+} , важен для белок-белкового взаимодействия с LP и NP. Область C-терминального домена содержит консервативные области, необходимые для взаимодействия с хозяйским эндосомальным комплексом сортировки, требуемым для транспортной системы, — специфическим белком Tsg-101 [19]. Вирионный GPC является тримером, состоящим из гетеродимеров, каждый из которых содержит гликопротеиды (GP) GP1 и GP2. Клеточная протеаза SKI-1-S1P осуществляет посттрансляционное расщепление GPC вируса. Стабильный сигнальный пептид помогает локализовать бел-

ковый комплекс на мембране. Белок GP2 является белком слияния типа 1 [15]. После слияния все 3 белка остаются связанными как GPC. Структура эктодомена GP ВЛ, состоящая из фрагментов GP1 и GP2, важна для связывания с клеточным рецептором. Основной клеточный рецептор для ВЛ — производное ксилозогликоуроновой кислоты — α -дистрогликановый гликопротеин поверхности клеток, взаимодействующий с внеклеточной структурой, связывающий GPC вируса с этой молекулой. Белок GP, определяющий инфекциозность ВЛ, тропизм и диапазон его хозяев, является основной мишенью для разрабатываемых вакцин. Помимо GP иммунной активностью обладают белки NP и Z [18].

Штаммы и изоляты

Штаммы и полевые изоляты ВЛ, известные к настоящему времени (общим количеством около 80), сгруппированы в 4 линии как генетические разновидности, рассматривается вопрос о наличии ещё 2 линий [3, 19, 20]. При этом не выявлено связи генетического разнообразия ВЛ и различий в клинических проявлениях болезни [1, 2]. Прототипным штаммом считают штамм Josiah (линия IV) из Сьерра-Леоне, который используют в большинстве исследований, в том числе при создании кандидатных вакцин и испытании противовирусных препаратов. Штаммы линий I–III были выделены только в Нигерии [21], тогда как штаммы линии IV — в нескольких западноаф-

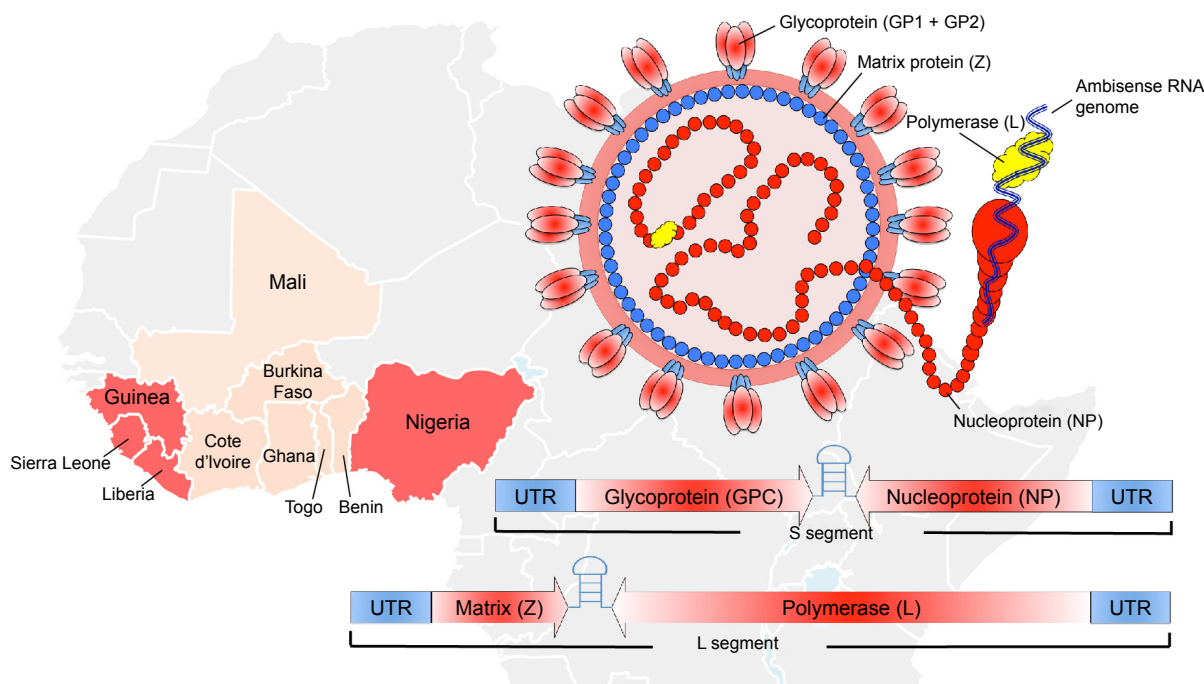


Рис. 1. Структура вириона ВЛ и его генома [17].

Оболочка вириона состоит из гликопротеинов GP1 и GP2, липопротеина и матричного белка (Z).
Геном состоит из большого (L) и малого (S) сегментов.

Fig. 1. Virion structure of the Lassa virus and its genome [17].

The virion shell consists of GP1 and GP2 glycoproteins, lipoprotein and matrix protein (Z).
The genome consists of large (L) and small (S) segments.

риканских странах [20]. Показано большое разнообразие геномов штаммов всех линий возбудителя с максимум расхождения 27% по нуклеотиду и 15% по аминокислотам [19, 22]. Сравнение структуры белков GP и NP штаммов различных линий, обычно используемых при разработке вакцин, выявило расхождение их аминокислотного состава: по GP — от 5,1 до 8,4%, по NP — от 6,3 до 10,7% [18]. Сравнение полноразмерных генных последовательностей 4 штаммов ВЛ, представляющих все линии, показало, что ген NP является более вариабельным (до 23,8% различий по нуклеотидам и 12,1% различий по аминокислотам), чем гены GP [19].

Сведения о гетерогенности штаммов ВЛ и их географическом распространении существенны при конструировании современных вакцин и оценке их эффективности, что определено рекомендациями ВОЗ [14].

Патогенез и иммуногенез

ВЛ проявляет широкий тканевой тропизм, поражая печень, селезёнку, надпочечники и другие органы. Как и все возбудители вирусных геморрагических лихорадок I группы патогенности, он генерализованно подавляет систему иммунитета. На первых этапах патогенеза ВЛ атакует антигенпрезентирующие клетки (АПК) миелоидного происхождения — дендритные и макрофаги. Эти типы клеток поддерживают высокий уровень репликации ВЛ. Инфекция противодействует активации и созреванию АПК, что приводит к нарушению обработки и презентации антигена [23, 24]. Несмотря на то что инфицированные АПК мигрируют в дренирующие лимфатические узлы, их созревание остаётся затруднённым на протяжении всего течения заболевания, вызывая нарушение регуляции адаптивного иммунного ответа и снижение клиренса вируса [23]. Более полное нарушение функции АПК при ЛЛ может коррелировать с отсутствием адаптивных иммунных реакций, приводящих к смерти. Презентация антигенов ВЛ незрелыми дендритными клетками может привести к иммунной толерантности и, в конечном счёте, к иммуносупрессии, что является определяющей особенностью патогенеза ЛЛ [22]. Ранние Т-клеточные реакции, степень выраженности которых определяет выживаемость при ЛЛ, — это истощение Т-клеток во вторичных лимфоидных тканях, транзиторная лимфопения и снижение пролиферации Т-клеток [25]. Иммунопатология приводит в целом к нарушению эндотелиального барьера, агрегации тромбоцитов и аномальной коагуляции [26].

При выборе путей разработки вакцин может быть успешным воспроизведение принципов создания удачных препаратов в отношении инфекций, при которых клеточный патогенез и иммуногенез схожи с таковыми у интересующего заболевания.

Для африканского континента в настоящее время наиболее значимыми инфекциями являются особо опасные геморрагические лихорадки Эбола и Ласса, клеточный патогенез и иммуногенез которых в достаточной степени близки [26]. Заражение этими возбудителями вызывает выработку высоких уровней воспалительных цитокинов, характеризующуюся как «цитокиновый шторм», который, вероятно, способствует коагулопатии, отёку и полиорганной недостаточности. Оба вируса первоначально заражают миелоидные клетки, включая дендритные клетки и макрофаги, и кодируют предотвращение передачи сигналов через путь RIG-I-подобного рецептора (RLR), митохондриального противовирусного сигнального белка (MAVS) и, следовательно, продукцию интерферона (IFN) I типа. После проникновения этих возбудителей в клетку и выхода РНК из нуклеопротеида инфицированная клетка распознаёт вирусную двухцепочечную РНК (dsRNA) I-митохондриальным противовирусным сигнальным белком (RIG-I-MAVS) или белком 5 (MDA5)–MAVS, что приводит к активации киназ — IκB-киназы-ε (ikke) и связывающей TANK-киназы 1 (TBK1), а также факторов транскрипции ядерного фактора κB (NF-κB), IFN, регуляторного фактора 3 (IRF3) и/или IRF7. Активация этих факторов транскрипции стимулирует экспрессию IFN типа I, который после секреции из инфицированной клетки связывается с рецептором IFN типа I (IFNAR1–IFNAR2) и активирует преобразователь сигналов киназы Януса — активатор сигнального каскада транскрипции (JAK–STAT). Активированные JAK-киназой факторы транскрипции STAT связываются с рецепторами соответствующих генов, стимулированных IFN (ISREs), для усиления экспрессии сотен генов, стимулированных IFN (ISGs), включая протеинкиназу R (PKR) и тетерин. Стратегии противодействия этим иммунным сигнальным путям, используемые при репродукции вирусами Эбола (EBOV) и Ласса (LASV), схематически отображены на **рис. 2**:

1) связывание с клеточными рецепторами TAM (TYRO3/AXL/MER) для проникновения вируса регулирует экспрессию супрессора сигнальных белков цитокинов (SOCS), которые ингибируют сигнализацию JAK–STAT;

2) вирусные белки подавляют активацию RIG-I-подобного рецептора (RLR), предотвращая распознавание вирусной dsRNA, которое опосредовано вирусным белком 35 (VP35) вируса Эбола или цинксвязывающим матричным белком (Z) ВЛ;

3) VP35 вируса Эбола ингибирует активацию ikke и TBK1 и подавляет транскрипционную активность IRF3 и IRF7;

4) VP24 вируса Эбола связывает кариоферин 5 (KPN 5) и предотвращает ядерную локализацию STAT1;

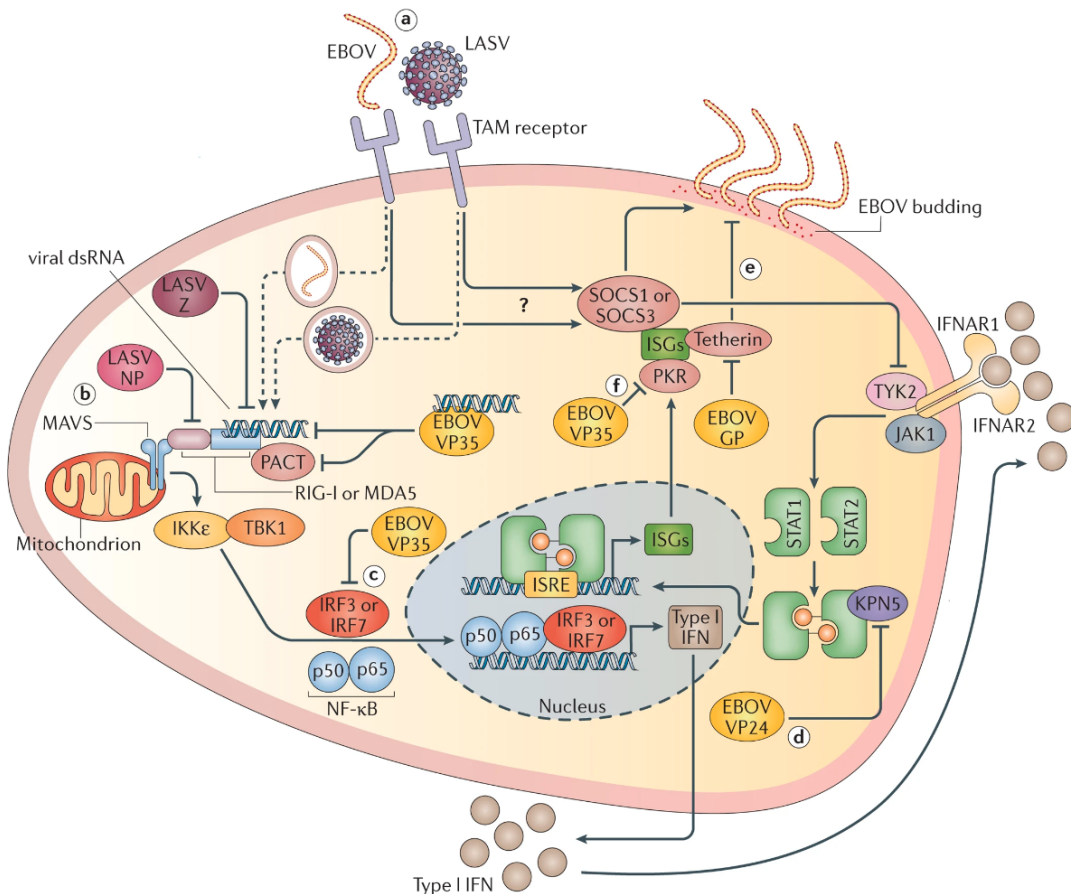


Рис. 2. Иммунная активация клеток-мишеней и противодействие ей вирусами Эбола и Ласса при репродукции [25].

Fig. 2. Immune activation of target cells and its counteraction by Ebola and Lassa viruses during reproduction [25].

5) тетерин ISG предотвращает размножение обоих вирусов, но эта активность подавляется только действием GP вируса Эбола;

6) ISG PKR противодействует VP35 вируса Эбола (ТYK2 — тирозинкиназа 2) [25].

Стратегии уклонения от иммунного надзора, описанные в пунктах 3)–6), реализуются только вирусом Эбола и, по нашему мнению, являются одними из определяющих его гораздо большую, чем у ВЛ, патогенность. Понимание вклада специфических иммунных реакций в защитные или патогенные реакции поможет в разработке терапевтических средств и вакцин. Представляется, что воспроизведение принципов создания наиболее удачных вакцин против лихорадки Эбола может быть успешным при разработке вакцин против ЛЛ в силу сходства их клеточного патогенеза и иммуногенеза.

Исследования профилей транскрипции генов ВЛ у заражённых обезьян и в клетках человека обеспечили понимание природы иммуногенеза и могут, в конечном счёте, способствовать появлению биомаркеров для разработки вакцин, а также прогнозированию серьёзности течения болезни и её исхода у больных. Количественный анализ в ОТ-ПЦР мРНК

макрофагальных клеток макаков циномоглусов, заражённых штаммом AV (линия IV [20]) ВЛ, обнаружил раннюю активацию интерфероновых генов типа I у выживших обезьян по сравнению с обнаружением этих транскриптов лишь на поздней стадии заболевания у погибших животных [27]. В совокупности со сведениями о развитии сильной активации Т-лимфоцитов и моноцитов у выживших обезьян эти данные, по нашему мнению, позволяют предположить, что такая ранняя активация иммунных реакций приводит к прерыванию инфекционного процесса.

В исследованиях, использующих анализ макрофагов макаков циномоглусов, заражённых штаммом Josiah ВЛ, выявлена ранняя индукция чувствительных к IFN Toll-подобных сигнальных рецепторов и отсутствие реакции генов противовоспалительных цитокинов [27]. В заражённых вирулентным штаммом Josiah ВЛ макрофагах были экспрессированы стимулированные IFN гены, регулирующие апоптоз, а также регулирующие транскрипционный фактор NF-κB, играющий ключевую роль в воспалительных и иммунных реакциях, что не отмечено в клетках, инфицированных апатогенным реассортантом вирусов Ласса и Мопея ML29 [28].

Данный факт может быть использован для прогнозирования результата исхода ЛЛ у больных по этим выявленным биомаркерам, а также для оценки апаптогенности препаратов при разработке вакцин.

У людей, заражённых ВЛ, отмечены снижение созревания дендритных клеток и снижение реакции Т-лимфоцитов *in vitro* [23, 29]. Несмотря на это нарушение презентации антигенов ВЛ клетками CD4⁺ и CD8⁺, реакции Т-лимфоцитов, обнаруженные на ранней стадии инфекции у людей, могут прогнозировать благоприятный исход заболевания. Показано, что у переболевших ЛЛ людей в эндемичных регионах были Ласса-специфичные CD4⁺-Т-лимфоциты памяти, специфичные к эпитопам нуклеопротеина и GPC, которые сохранялись в течение многих лет после ЛЛ [15, 29], что указывает, вероятно, на более важную роль в защите от данной инфекции клеточного иммунитета, чем гуморального. Выжившие после ЛЛ люди в Гвинее имели сильные реакции CD4⁺-Т-клеток памяти к консервативным эпитопам NP и GP2 штамма Josiah и нигерийских штаммов. У реконвалесцентов выделяли высокоактивные вируснейтрализующие антитела, которые защищали животных от гибели [1, 30].

Исследования передачи защитной эффективности Ласса-специфичных Т-лимфоцитов были выполнены с использованием клеток мышей с врождённой устойчивостью к вирусу ЛХМ, иммунизированных GPC ВЛ. У мышей-реципиентов Т-лимфоцитов была слабая защита от инфекции [31], видимо, из-за интерференции на стадии иммунизации врождённо-специфичных к нуклеопротеину вируса ЛХМ цитотоксических Т-лимфоцитов с GPC близкородственного ВЛ. Это исследование как модельная оценка существенно для прогнозирования снижения защитной эффективности вакцин против ЛЛ в отношении людей, ранее перенёсших заражение близкородственным аренавирусом ЛХМ, распространённым в Африке. В защите от инфекции предполагаемая роль Т-лимфоцитов существенна, т.к. некоторые испытуемые кандидатные вакцины, индуцируя только гуморальный иммунный ответ, защищали от смертельного исхода лишь малую долю инфицированных обезьян, в то время как другие препараты, индуцирующие и клеточный, и гуморальный ответы, защищали всех инфицированных животных [4]. В реакции иммунофлюоресценции показано, что в динамике у обезьян уровень антител постепенно уменьшался, но после повторной инфекции вновь повышался [32].

У людей, инфицированных ВЛ, продуцируются в низких титрах специфичные к GP и NP возбудителя иммуноглобулины M и G. Выработка антител не коррелирует с исходом заболевания. Нейтрализующие антитела в низких концентрациях обнаруживаются через несколько месяцев после выздоровления, но в динамике реконвалесценции

концентрация нейтрализующих антител возрастает, возможно, из-за сохраняющегося вируса, продолжающего стимулировать В-клетки, реакция которых снижена во время острой фазы инфекции [22]. Исследование нейтрализующих моноклональных антител, полученных от переболевших ЛЛ людей, показало, что они связываются с эпитопами GPC, но не с эпитопами GP1 или GP2². Структура эктодомена GPC, связывающегося с человеческими моноклональными антителами, определена. Механизм нейтрализации основан на способности этих антител предотвращать требуемые для GPC конформационные изменения рецептора при слиянии вируса с мембранами [33]. Введение сывороток от переболевших ЛЛ людей или животных обеспечивало защиту нечеловекообразных обезьян от летальных доз ВЛ. Исследование на морских свинках эффективности такой пассивной передачи показало, что защита от гибели была тесно связана с высоким уровнем только вируснейтрализующих, но не других антител, выявляемых в иммуноферментном анализе [34, 35].

Смесь человеческих моноклональных высокоаффинных антител к GPC штаммов линий II, III и IV ВЛ обеспечивала защиту от гибели аутбредных морских свинок в случае применения непосредственно после инфицирования [35]. В то же время, если вируснейтрализующие антитела обеспечивали защиту от смертельного исхода морских свинок мышей и обезьян, то попытки лечения людей введением иммунной плазмы были безуспешны [11]. Клиренс ВЛ в крови инфицированных животных или больных людей не коррелировал с уровнем антител, выявляемых в иммуноферментном анализе [33, 35, 36].

Представленные данные показывают, что при репродукции в клетках-мишенях ВЛ реализуются несколько механизмов противодействия клеточному иммуногенезу — подавление экспрессии супрессора сигнальных белков, цитокинов и рецептора RLR, распознающего вирусную двухсегментную РНК. При формировании защитного иммунитета у животных и человека главенствующее значение имеет его клеточная составляющая, реализуемая Т-лимфоцитами, гуморальная компонента играет меньшую роль в естественно приобретённом иммунитете. Роль антител разных классов в защите от ЛЛ неодинакова. Значимость иммуноглобулинов при данной инфекции, в том числе для лечения людей, до настоящего времени окончательно не определена [11, 15]. Возможно предположить, что вакцины, способные индуцировать высокую активность Т-лимфоцитов и выработку вирусней-

² GlobeNewswire. GeoVax reports promising results for Lassa fever vaccine. GeoVax; 2017. URL: <https://www.globenewswire.com/en/news-release/2017/07/10/1245609/0/en/GeoVax-Reports-Promising-Results-for-Lassa-Fever-Vaccine.html>

трализирующих антител, обеспечат защиту от данной инфекции. Выработка специфических Т-лимфоцитов и вируснейтрализующих антител может иметь важное маркерное значение при разработке вакцин.

Разработка вакцинных препаратов

Необходимость разработки вакцин против ЛЛ определяется, в частности, отсутствием эффективных этиотропных химиопрепаратов. В опытах на животных при ЛЛ выявлено противовирусное действие химиопрепарата рибавирин, который, однако, при использовании внутривенно в высоких дозах при лечении людей оказался малоэффективным и вызывал значительные побочные эффекты [2, 15, 37]. Нуклеозидный аналог фавипиравир (Т-705) при лечении обезьян был эффективнее рибавирина (снизившего лишь уровень вирусемии), защитив 100% животных от летальной дозы ВЛ [10]. В опытах на грызунах другие нуклеозидные аналоги (Stampidine, Zidampidine) и ингибитор размножения аренавирусов ST-193 имели низкие уровни защитной эффективности [38].

Считается, что однократное заражение ВЛ вызывает пожизненный защитный иммунитет. Это предполагает, что длительный протективный иммунитет, вызванный вакцинацией, является достижимой целью. Штаммы ВЛ гетерогенны по аминокислотам белков GPC и NP [19, 22], что осложняет разработку эффективных универсальных вакцин против всех линий возбудителя. В пользу целесообразности разработки подобного поливалентного препарата косвенно свидетельствуют данные о высокой эффективности лабораторно полученного «коктейля» нейтрализующих антител к белкам GP четырех линий ВЛ, защитившего от гибели 100% инфицированных летальными дозами обезьян [6].

При разработке кандидатных вакцин против ЛЛ были использованы различные стратегии. Первоначально оценили эффективность инактивированного вируса — у иммунизированных животных выявляли формирование NP- и GPC-специфических иммуноглобулинов, но это не обеспечивало защиты от летальной инфекции, вызванной ВЛ [39], что показало недостаточность развития лишь гуморального ответа в отсутствие клеточного. В последующих разработках стали использовать модифицированный возбудитель или его компоненты. Белок GP1 ВЛ, включенный в полимерную нанокapsулу (нанокomплекс, обозначенный как LASVGP1), вызывал у мышей высокие уровни CD4⁺-Т-лимфоцитов и В-клеток с выработкой антител, имеющих выраженное специфическое родство к GP1 ВЛ, однако этот нанокomплекс имел низкую защитную эффективность [40]. Методами обратной генетики перестройкой некодирующей межгенной области генома ВЛ — заменой некодирующего межгенного региона (IGR) L-сегмента на аналогичную структуру S-сег-

мента — создан кандидатный вакцинный препарат rLASV(IGR/S-S); исследование на морских свинках показало, что он защищал всех животных от летальной дозы ВЛ [39]. Ослабленный нативный вирус был получен модификацией нуклеотидной последовательности гена GP — полученный препарат rLASV-GPC/CD был малопатогенен для морских свинок и обладал протективными свойствами [41]. Перспективным оказалось и создание вирусоподобных частиц, содержащих все белки ВЛ, — препараты WT-WT и WT-Eco(N) защитили всех морских свинок от заражения летальной дозой ВЛ [42].

Наибольшее количество разработок вакцин нового поколения против ЛЛ было связано с конструированием векторных рекомбинантов на основе различных платформ — штамма 17D флавивируса жёлтой лихорадки [43], альфавируса венесуэльского энцефаломиеелита лошадей [44], вируса везикулярного стоматита [45], штаммов NYВH и Lister осповакцины [46], аренавируса Мопея [1, 47], вируса кори [48], сальмонелл [49], иных возбудителей. Другие стратегии связаны с созданием ДНК-вакцин [50]. Живые ослабленные или векторные кандидатные вакцины, генерирующие белки NP и/или GPC ВЛ, вызывали у животных высокую активацию CD8⁺-Т-лимфоцитов.

Штамм 17D вируса жёлтой лихорадки был исследован как вектор для экспрессии антигенов ВЛ. Рекомбинант был получен вставкой гена GPC штамма AV ВЛ (линия IV) между генами E и NS1 вектора. Введением рекомбинантного вируса YF17D/LASVΔGPC иммунизировали макаков циномоглусов. Бустерные иммунизации проводили на 14-е и 30-е сутки с последующим инфицированием летальной дозой штамма Josiah. Этот кандидатный препарат не обеспечил защиты, и все привитые животные умерли с клиническими признаками ЛЛ [43].

Макаки циномоглусы, иммунизированные рекомбинантом на платформе вируса везикулярного стоматита (препарат rVSVΔG/LVGPC), экспрессирующим GP ВЛ, после заражения летальной дозой штамма Josiah не погибли на фоне мощной стимуляции гуморального и клеточного иммунитета этим препаратом [45].

Оценка эффективности рекомбинантов ВЛ и штамма Ankara вируса осповакцины (Geo-LM01, rVACC-LSGPC и др.) выявила 100% защиту мышей от введения летальной дозы ВЛ. У привитых мышшей была выражена иммунная реакция Т-лимфоцитов через 10 сут после вакцинации [52]. В другом исследовании рекомбинантного вируса осповакцины, экспрессирующего различные области GPC и NP ВЛ, было определено, что для защиты необходимы как GP1 и GP2, так и полный GPC [43]. Эффективность рекомбинанта вируса осповакцины rVACC-LSGPC, экспрессирующего GPC ВЛ, была оценена на обезьянах, инфицированных летальной

дозой штамма Josiah. Все обезьяны выжили, но у них были лёгкая лихорадка и вирусемия с низкими титрами [46, 52].

Вирус Мопея иммунологически родственен ВЛ. Они имеют одинаковые эпитопы NP и GP2, однако этого оказалось недостаточно для обеспечения защиты животных от ЛЛ [53]. Реассортантная кандидатная вакцина MOPV/LASV (ML29) была разработана для сохранения непатогенного профиля вируса Мопея с индукцией иммунной защиты против ВЛ. Она несёт гены L-сегмента РНК штамма An20410 вируса Мопея и S-сегмента РНК штамма Josiah ВЛ. Эта кандидатная вакцина была безопасна, иммуногена и эффективна для мармозеток [47]. Иммунизация препаратом ML29 индуцировала высокий уровень CD4⁺- и CD3⁺-Т-лимфоцитов у всех иммунизированных животных [43]. Реассортант индуцирует иммунитет, защищающий от штаммов из Сьерра-Леоне и Нигерии, относящихся к линиям I и IV возбудителя. Эти результаты показывают, что реассортант ML29 безопасен, иммуногенен и индуцирует широкий перекрёстный защитный иммунитет, опосредованный Т-клетками [1]. Методами обратной генетики для расширения диапазона перекрёстной защиты получен модифицированный препарат r3ML29, экспрессирующий дополнительные антигены ВЛ — GPC и NP штамма LP (линия I) [53]. Крайне ограниченные сведения о патогенности вируса Мопея для человека вызывают опасения о возможности использования его рекомбинанта с ВЛ в качестве вакцины. В связи с этим методом обратной генетики был получен ослабленный вирус Мопея путём изменения домена 3'-5' экзонуклеазы NP, необходимого для его противоинтерферонной активности. Ген *LASV/JOS-GPC* был клонирован и экспрессирован в экзоне 6b конструкции MOPVAC. Однократная иммунизация полученным препаратом MOPVAC LASV защитила 100% обезьян от гибели после заражения ВЛ [53].

Разработана кандидатная ослабленная живая векторная вакцина на платформе штамма Schwarz вируса кори, экспрессирующая белки GPC и NP ВЛ (MV-LASV-NP + GPC). Препарат защитил яванских макаков от смертельной дозы ВЛ [48, 54]. Начата I стадия клинических испытаний данного препарата на безопасность, переносимость и иммуногенность [55].

ДНК-технология с использованием бактериальных плазмид, несущих код полипептидной последовательности необходимых антигенов [56], также была применена при разработке вакцин против ЛЛ. При исследовании кандидатной ДНК-вакцины (pLASV-GPC) на макаках циномоглусах животным с помощью электропорации ввели препарат, содержащий ген *GPC* штамма Josiah ВЛ. Все животные, заражённые летальной дозой штамма Josiah, выжили без лихорадки и вирусемии [50]. Кандидатная

ДНК-вакцина (INO-4500), вводимая путём внутрикожной электропорации, показала 100% защиту обезьян от смертельной дозы штамма Josiah. Проходит рандомизированное двойное слепое исследование этого препарата на добровольцах в США и Республике Гана, оценивающее нежелательные явления и иммунологические профили, включая титры антител, в том числе нейтрализующих, и уровень ответного IFN- γ [55, 57]. Основные направления разработки кандидатных вакцин против ЛЛ и некоторые характеристики наиболее эффективных препаратов представлены в **таблице**.

В последние годы начаты исследования по другим направлениям. Так, на основе вектора ChAdOx1 аденовируса Y25 шимпанзе создан рекомбинант, экспрессирующий GPC штамма Josiah — ChAdOx1-Lassa-GP. Препарат продемонстрировал защитную эффективность при испытании на морских свинках и мышах, вызвав индукцию Т-клеток на GP ВЛ линий I–III ВЛ [22].

К настоящему времени разработано более 130 потенциальных кандидатных вакцин против ЛЛ [58], но ни одна из них не проходила клинической оценки защитной эффективности в эпидемиологических исследованиях и лишь две — рекомбинант вирусов кори/Ласса (MV-LASV-NP + GPC) и ДНК-вакцина (INO-4500)³ — проходят испытания на добровольцах на иммуногенность и безвредность. Перспективными кандидатными вакцинами представляются также рекомбинант вирусов везикулярного стоматита/Ласса (rVSV Δ G/LVGPC), ДНК-вакцина (pLASV-GPC), реассортанты вирусов Мопея/Ласса (ML29 и r3ML29), продуцирующие полноценный иммунный ответ и защиту обезьян после однократного введения.

Кандидатная вакцина rVSV Δ G/LVGPC на платформе вируса везикулярного стоматита, по нашему мнению, может быть весьма эффективной для защиты людей от ЛЛ, о чём косвенно свидетельствует следующее. Как было отмечено выше, воспроизведение принципов создания наиболее удачных вакцин против лихорадки Эбола может быть успешным при разработке вакцин против ЛЛ в силу сходства их клеточного патогенеза и иммуногенеза. Наиболее перспективной вакциной против лихорадки Эбола является рекомбинант rVSV Δ G-ZEBOV-GP, в котором GP оболочки вируса везикулярного стоматита заменён GP штамма Заир вируса Эбола. Эта лицензированная вакцина продемонстрировала 100% защиту 15 399 человек в ходе кольцевой вакцинации, проведённой в Гвинее в 2015 г., и в настоящее время используется в Демократической Республике Конго [59].

³ ClinicalTrials.gov. Dose-ranging study: Safety, tolerability and immunogenicity of INO-4500 in healthy volunteers in Ghana; 2019. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04093076> (дата обращения January 25, 2022).

Основные направления разработки кандидатных вакцин против ЛЛ и эффективность препаратов

The main directions of development of candidate vaccines against Lassa fever and the effectiveness of drugs

Препарат (наименование) Drug (name)	Тестовые объекты Test objects	Антиген; штамм (линия) Antigen; strain (line)	Тестовый параметр Test parameter	Эффект, процент Efficiency, percent	Год, ссылка Year, reference
Модификация возбудителя Modification of the pathogen					
Инактивированный ВЛ Inactivated Lassa virus	Обезьяны Monkeys	Смесь штаммов Strain mix	Антитела Antibodies	100	1992 [39]
			Выживаемость Survival rate	0	
Наночастицы с GP1, инкапсулированные в полимеры (LASVGP1) Nanoparts with GP1, polymers encapsulated (LASVGP1)	Мыши Mouse	GP1; нет данных GP1; no data	Антитела Antibodies	100	2017 [40]
			T, B-лимфоциты T, B-lymphocytes	100	
			Выживаемость Survival rate	0	
Вирус Ласса с перестроенным геномом rLASV(IGR/S-S) Lassa virus with a rearranged genome rLASV(IGR/S-S)	Морские свинки Guinea pigs	Josiah (IV)	Выживаемость Survival rate	100	2020 [37]
Создание рекомбинантных (реассортантных) конструкций Creation of recombinant (reassortant) structures					
Реассортанты вирусов Мопея/Ласса: Reassortant of Mopeya/Lassa viruses: • ML29 • r3ML29	Обезьяны Monkeys	GPC + NP; Josiah (IV)	Антитела Antibodies	100	2012 [43]
			T, B-лимфоциты T, B-lymphocytes	100	2019 [1]
			Выживаемость Survival rate	100	2018 [53]
Рекомбинант вирусов жёлтой лихорадки/Ласса (YF17D/LASVΔGPC) Recombinant viruses Yellow fever/Lassa (YF17D/LASVΔGPC)	Обезьяны Monkeys	GPC; AV (IV)	Антитела Antibodies	100	2012 [43]
			Выживаемость Survival rate	0	
Рекомбинант вирусов везикулярного стоматита/Ласса (rVSVΔG/LVGPC) Recombine of vesicular stomatitis/Lassa viruses (rVSVΔG/LVGPC)	Морские свинки Guinea pigs	GP; Josiah (IV)	Антитела Antibodies	100	2020 [45]
			T, B-лимфоциты T, B-lymphocytes	100	
			Выживаемость Survival rate	0	
Рекомбинант вирусов осповакцины/Ласса (rVACC-LSGPC) Recombinant smallpox vaccine/Lassa viruses (rVACC-LSGPC)	Обезьяны Monkeys	GPC; Josiah (IV)	Антитела Antibodies	100	2004 [52]
			T, B-лимфоциты T, B-lymphocytes	100	
			Выживаемость Survival rate	100	
Рекомбинант вирусов кори/Ласса (MV-LASV-NP + GPC) Recombinant Measle/Lassa viruses (MV-LASV-NP + GPC)	Обезьяны Monkeys	GPC + NP; Josiah (IV)	Выживаемость Survival rate	100	2020 [54]
			Люди Human	Безвредность, иммуногенность Harmlessness, immunogenicity	
Разработка ДНК-вакцин Development of DNA vaccines					
ДНК-вакцина (pLASV-GPC) DNA-vaccine (pLASV-GPC)	Обезьяны Monkeys	GPC; Josiah (IV)	Выживаемость Survival rate	100	2017 [49]
ДНК-вакцина (INO-4500) DNA-vaccine (INO-4500)	Обезьяны Monkeys		Выживаемость Survival rate	100	2019 [50, 57]
			Люди Human	Безвредность, антитела, T-лимфоциты, IFN-γ Harmlessness, antibodies, T-lymphocytes, IFN-γ	

Заключение

Опасность лихорадки Ласса длительное время недооценивали, однако после нескольких эпидемий 2015–2016 гг. в Нигерии, где летальность среди лабораторно подтверждённых случаев достигла 59,6%, ВОЗ определила её возбудитель приоритетным патогеном для разработки вакцин и объявила чрезвычайную ситуацию в области общественного здравоохранения. ВОЗ опубликовала требования для этой вакцины — оптимальные кандидатные вакцины должны соответствовать следующим критериям: иметь приемлемые безопасность/реактогенность, высокую ($\geq 70\%$) эффективность в предотвращении заражения или заболевания, вызванного штаммом возбудителя линий I–IV, и обеспечивать длительную (≥ 5 лет) защиту от нигерийских штаммов, иметь минимальный срок годности 12 мес при -20°C и 6 мес при $2-8^\circ\text{C}$ [17].

Сложности разработки вакцин против ЛЛ определяются высокой опасностью возбудителя и особенностями его биологии. Работы с вирусом I группы патогенности можно проводить лишь в лабораториях наивысшего уровня защиты (BSL-4), количество которых в мире невелико (в России — лишь 2). Для разработки поливалентной вакцины против ЛЛ серьёзной проблемой является генетическое разнообразие циркулирующих в очагах штаммов, гетерогенных по аминокислотам белков GPС и NP, что осложняет создание эффективных универсальных вакцин против всех линий возбудителя. Одной из важнейших характеристик живой кандидатной вакцины должна быть генетическая стабильность для исключения реверсии в направлении к более патогенному генотипу, что особенно важно для РНК-содержащих вирусов, поскольку механизм их репликации, подверженный высокой частоте ошибок, приводит к быстрой эволюции.

Изложенные материалы показывают, что защита от ВЛ формируется в основном посредством клеточного иммунитета, что должно определять на лабораторной стадии разработки вакцин основной критерий (биомаркер) выбора наиболее эффективных препаратов — уровень и характер ответных реакций Т-лимфоцитов у подопытных животных. Гуморальный ответ менее значим для прогнозирования эффективности кандидатного препарата. Анализ данных по иммуногенезу ЛЛ выявляет особенность перспективных кандидатных вакцин — предпочтительным препаратом была бы реплицирующаяся и апатогенная вакцина, способная индуцировать правильное сочетание клеточных и гуморальных ответов. К настоящему времени самые многообещающие разработанные кандидатные препараты нового поколения основаны на использовании ДНК-платформ, а также рекомбинантов ВЛ с вирусами кори, везикулярного стоматита, Мопейи. Показано, что только реассортант r3ML29 защища-

ет от штаммов из Сьерра-Леоне и Нигерии, относящихся к линиям IV и I возбудителя. В силу сходства клеточного патогенеза и иммуногенеза ВЛ и вируса Эбола, несомненно, перспективна кандидатная вакцина rVSVΔG/LVGPC против ВЛ, аналогичная по конструкции лицензированной вакцине rVSVΔG-ZEBOV-GP против лихорадки Эбола.

Известна истина: «Мы не можем предугадать будущее, но мы можем подготовиться к нему». Пандемия новой коронавирусной инфекции, вызванная вирусом SARS-CoV-2, показывает возникшие при этом сложности с экстренной разработкой и выпуском этиотропных средств профилактики и лечения. Накопленный при этом организационный опыт свидетельствует об актуальности постоянной разработки средств специфической защиты в отношении значимых особо опасных инфекций, в том числе ЛЛ, в плане готовности обеспечения биологической безопасности населения Российской Федерации.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Lukashevich I.S., Paessler S., de la Torre J.C. Lassa virus diversity and feasibility for universal prophylactic vaccine. *F1000Res*. 2019;8:F1000 Faculty Rev-134. DOI: <https://doi.org/10.12688/f1000research.16989.1>
2. Asogun D.A., Günther S., Akpede G.O., et al. Lassa fever: Epidemiology, clinical features, diagnosis, management and prevention. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 2019;33(4):933–51. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idc.2019.08.002>
3. Safronetz D., Schmaljohn C. Editorial overview: Lassa virus. *Curr. Opin. Virol.* 2019;37:vii–ix. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2019.09.001>
4. Fisher-Hoch S.P., Hutwagner L., Brown B., McCormick J.B. Effective vaccine for Lassa fever. *J. Virol.* 2000;74(15):6777–83. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.74.15.6777-6783.2000>
5. Shimojima M., Ströher U., Ebihara H., et al. Identification of cell surface molecules involved in dystroglycan-independent Lassa virus cell entry. *J. Virol.* 2012;86(4):2067–78. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.06451-11>
6. Mire C.E., Cross R.W., Geisbert J.B., et al. Human-monoclonal-antibody therapy protects nonhuman primates against advanced Lassa fever. *Nat. Med.* 2017;23(10):1146–9. DOI: <https://doi.org/10.1038/nm.4396>
7. Ilori E.A., Frank C., Dan-Nwafor C.C., et al. Increase in Lassa fever cases in Nigeria, January–March 2018. *Emerg. Infect. Dis.* 2019;25(5):1026–7. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2505.181247>
8. Okogbenin E.O., Obagaye M.O., Aweh B.E., et al. One-year retrospective review of psychiatric consultations in Lassa fever, Southern Nigeria. *Emerg. Inf. Dis.* 2020;26(12):3091–3. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2612.200084>
9. Leifer E., Gocke D.J., Bourne H. Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. II. Report of a laboratory acquired infection treated with plasma from a person recently recovered from the disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1970;19(4):677–9. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1970.19.677>
10. Lingas G., Rosenke K., Safronetz D., et al. Lassa viral dynamics in non-human primates treated with favipiravir or ribavirin. *PLoS Comput. Biol.* 2021;17(1):e1008535. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008535>
11. Cross R.W., Hastie K.M., Mire C.E., et al. Antibody therapy for Lassa fever. *Curr. Opin. Virol.* 2019;37:97–104. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2019.07.003>

12. Kofman A., Choi M.J., Rollin P.E. Lassa fever in travelers from West Africa, 1969–2016. *Emerg. Inf. Dis.* 2019;25(2):236–9. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2502.180836>
13. Wolf T., Ellwanger R., Goetsch U., et al. Fifty years of imported Lassa fever: a systematic review of primary and secondary cases. *J. Travel. Med.* 2020;27(4):1–17. DOI: <https://doi.org/10.1093/jtm/taaa035>
14. Salami K., Gsell P.S., Olayinka A., et al. Meeting report: WHO consultation on accelerating Lassa fever vaccine development in endemic countries, Dakar, 10–11 September 2019. *Vaccine.* 2020;38(26):4135–41. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.01.017>
15. Behrens R., Houlihan C. Lassa fever. *BMJ.* 2017;358:j2986. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmj.j2986>
16. Radoshitzky S.R., Buchmeier M.J., Charrel R.N., et al. ICTV virus taxonomy profile: Arenaviridae. *J. Gen. Virol.* 2019;100(8):1200–1. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001280>
17. Warner B.M., Safronetz D., Stein D.R. Current research for a vaccine against Lassa hemorrhagic fever virus. *Drug. Des. Dev. Ther.* 2018;12:2519–27. DOI: <https://doi.org/10.2147/DDDT.S147276>
18. Klitting R., Mehta S.B., Oguzie J.U., et al. Lassa virus genetics. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2020; online ahead of print. DOI: https://doi.org/10.1007/82_2020_212
19. Bowen M.D., Rollin P.E., Ksiazek T.G., et al. Genetic diversity among Lassa virus strains. *J. Virol.* 2000;74(15):6992–7004. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.74.15.6992-7004.2000>
20. Whitmer S.L.M., Strecker T., Cadar D. New lineage of Lassa virus, Togo, 2016. *Emerg. Inf. Dis.* 2018;24(3):599–602. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2403.171905>
21. Happi A.N., Happi C.T., Schoepp R.J. Lassa fever diagnostics: Past, present, and future. *Curr. Opin. Virol.* 2019;37:132–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2019.08.002>
22. Purushotham J., Lambe T., Gilbert S.C., Purushotham J. Vaccine platforms for the prevention of Lassa fever. *Immunol. Lett.* 2019;215:1–11. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2019.03.008>
23. Baize S., Kaplon J., Faure C., et al. Lassa virus infection of human dendritic cells and macrophages is productive but fails to activate cells. *J. Immunol.* 2004;172(2):2861–9. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.2861>
24. Schaeffer J., Carnec X., Reynard S., et al. Lassa virus activates myeloid dendritic cells but suppresses their ability to stimulate T cells. *PLoS Pathog.* 2018;14(11):e1007430. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007430>
25. Prescott J.B., Marzi A., Safronetz D., et al. Immunobiology of Ebola and Lassa virus infections. *Nat. Rev. Immunol.* 2017;17(3):195–207. DOI: <https://doi.org/10.1038/nri.2016.138>
26. Horton L.E., Cross R.W., Hartnett J.N. Endotheliopathy and platelet dysfunction as hallmarks of fatal Lassa fever. *Emerg. Inf. Dis.* 2020;26(11):2625–37. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2611.191694>
27. Malhotra S., Yen J.Y., Honko A.N., et al. Transcriptional profiling of the circulating immune response to Lassa virus in an aerosol model of exposure. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013;7(4):e2171. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002171>
28. Zapata J.C., Carrion R.Jr., Patterson J.L., et al. Transcriptome analysis of human peripheral blood mononuclear cells exposed to Lassa virus and to the attenuated Mopeia/Lassa reassortant 29 (ML29), a vaccine candidate. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013;7(9):e2406. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002406>
29. Flatz L., Rieger T., Merkle D., et al. T cell-dependence of Lassa fever pathogenesis. *PLoS Pathog.* 2010;6(3):e1000836. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000836>
30. Hallam H.J., Hallam S., Rodriguez S.E., et al. Baseline mapping of Lassa fever virology, epidemiology and vaccine research and development. *NPJ Vaccines.* 2018;3:11. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41541-018-0049-5>
31. Lee A.M., Cruite J., Welch M.J., et al. Pathogenesis of Lassa fever virus infection: I. Susceptibility of mice to recombinant Lassa Gp/LCMV chimeric virus. *Virology.* 2013;442(2):114–21. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.010>
32. Monath T.P. A short history of Lassa fever: The first 10–15 years after discovery. *Curr. Opin. Virol.* 2019;37:77–83. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2019.06.005>
33. Hastie K.M., Zandonatti M.A., Kleinfelter L.M., et al. Structural basis for antibody-mediated neutralization of Lassa virus. *Science.* 2017;356(6341):923–8. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aam7260>
34. Jahrling P.B., Frame J.D., Rhoderick J.B., Monson M.H. Endemic Lassa fever in Liberia. IV. Selection of optimally effective plasma for treatment by passive immunization. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1985;79(3):380–4. DOI: [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(85\)90388-8](https://doi.org/10.1016/0035-9203(85)90388-8)
35. Cross R.W., Mire C.E., Branco L.M., et al. Treatment of Lassa virus infection in outbred guinea pigs with first-in-class human monoclonal antibodies. *Antivir. Res.* 2016;133:218–22. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.08.012>
36. Robinson J.E., Hastie K.M., Cross R.W., et al. Most neutralizing human monoclonal antibodies target novel epitopes requiring both Lassa virus glycoprotein subunits. *Nat. Commun.* 2016;7:11544–52. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms11544>
37. Cai Y., Iwasaki M., Motooka D., et al. A Lassa virus live-attenuated vaccine candidate based on rearrangement of the intergenic region. *mBio.* 2020;11(2):e00186-20. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.00186-20>
38. Cashman K.A., Smith M.A., Twenhafel N.A., et al. Evaluation of Lassa antiviral compound ST-193 in a guinea pig model. *Antivir. Res.* 2011;90(1):70–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.02.012>
39. McCormick J.B., Mitchell S.W., Kiley M.P., et al. Inactivated Lassa virus elicits a non-protective immune response in rhesus monkeys. *J. Med. Virol.* 1992;37(1):1–7. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.1890370102>
40. Galan-Navarro C., Rincon-Restrepo M., Zimmer G., et al. Oxidation-sensitive polymersomes as vaccine nanocarriers enhance humoral responses against Lassa virus envelope glycoprotein. *Virology.* 2017;512:161–71. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.09.013>
41. Cai Y., Ye C., Cheng B., et al. A Lassa fever live-attenuated vaccine based on codon deoptimization of the viral glycoprotein gene. *mBio.* 2020;11(1):e00039-20. DOI: <https://doi.org/10.1128/mbio.00039-20>
42. Kainulainen M.H., Spengler J.R., Welch S.R., et al. Use of a scalable replicon-particle vaccine to protect against lethal Lassa virus infection in the Guinea pig model. *J. Infect. Dis.* 2019; 217(12): 1957–66. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy123>
43. Lukashevich I.S. Advanced vaccine candidates for Lassa fever. *Viruses.* 2012;4(11):2514–57. DOI: <https://doi.org/10.3390/v4112514>
44. Pushko P., Geisbert J., Parker M., et al. Individual and bivalent vaccines based on alphavirus replicons protect guinea pigs against infection with Lassa and Ebola viruses. *J. Virol.* 2001;75(23):11677–85. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.75.23.11677-11685.2001>
45. Cross R.W., Xu R., Matassov D., et al. Quadrivalent VesiculoVax vaccine protects nonhuman primates from viral-induced hemorrhagic fever and death. *J. Clin. Invest.* 2020;130(1):539–51. DOI: <https://doi.org/10.1172/jci131958>
46. Fisher-Hoch S.P., McCormick J.B., Auperin D., et al. Protection of rhesus monkeys from fatal Lassa fever by vaccination with a recombinant vaccinia virus containing the Lassa virus glycoprotein gene. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1989;86(1):317–21. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.86.1.317>

ОБЗОРЫ

47. Lukashevich I.S., Patterson J., Carrion R., et al. A live attenuated vaccine for Lassa fever made by reassortment of Lassa and Mopeia viruses. *J. Virol.* 2005;79(22):13934–42.
DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.79.22.13934-13942.2005>
48. Frantz P.N., Teeravechyan S., Tangy F. Measles-derived vaccines to prevent emerging viral diseases. *Microbes Infect.* 2018;20(9-10):493–500.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2018.01.005>
49. Djavani M., Yin C., Lukashevich I.S., et al. Mucosal immunization with *Salmonella typhimurium* expressing Lassa virus nucleocapsid protein cross-protects mice from lethal challenge with lymphocytic Choriomeningitis virus. *J. Hum. Virol.* 2001;4(2):103–8.
50. Cashman K.A., Wilkinson E.R., Shaia C.I., et al. A DNA vaccine delivered by dermal electroporation fully protects cynomolgus macaques against Lassa fever. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2017;13(12):2902–11.
DOI: <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1356500>
51. Salvato M.S., Domi A., Guzmán-Cardozo C., et al. A single dose of modified vaccinia Ankara expressing Lassa virus-like particles protects mice from lethal intracerebral virus challenge. *Pathogens.* 2019;8(3):133.
DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens8030133>
52. Fisher-Hoch S.P., McCormick J.B. Lassa fever vaccine. *Expert Rev. Vaccines.* 2004;3(2):189–97.
DOI: <https://doi.org/10.1586/14760584.3.2.189>
53. Carnec X., Mateo M., Page A. A vaccine platform against arenaviruses based on a recombinant hyperattenuated Mopeia virus expressing heterologous glycoproteins. *J. Virol.* 2018;92(12):e02230-17.
DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.02230-17>
54. Busch E., Kubon K.D., Mayer J.K.M., et al. Measles vaccines designed for enhanced CD8+ T cell activation. *Viruses.* 2020;12(2):242. DOI: <https://doi.org/10.3390/v12020242>
55. Попова О.Д., Зубкова О.В., Ожаровская Т.А. и др. Обзор кандидатных вакцин для профилактики лихорадки Ласса. *Вопросы вирусологии.* 2021;66(2):91–102.
Popova O.D., Zubkova O.V., Ozharovskaia T.A., et al. Review of candidate vaccines for the prevention of Lassa fever. *Problems of Virology.* 2021;66(2):91–102.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-33>
EDN: <https://elibrary.ru/rjbwsm>
56. Gary E.N., Weiner D.B. DNA vaccines: Prime time is now. *Curr. Opin. Immunol.* 2020;65:21–7.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coi.2020.01.006>
57. Garnett L.E., Strong J.E. Lassa fever: With 50 years of study, hundreds of thousands of patients and an extremely high disease burden, what have we learned? *Curr. Opin. Virol.* 2019;37:123–31. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2019.07.009>
58. Salami K., Gouglas D., Schmaljohn C., et al. A review of Lassa fever vaccine candidates. *Curr. Opin. Virol.* 2019;37:105–11. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2019.07.006>
59. Medaglini D., Santoro F., Siegrist C.A. Correlates of vaccine-induced protective immunity against Ebola virus disease. *Semin. Immunol.* 2018 Oct;39:65–72.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.smim.2018.07.003>

Информация об авторе

Маркин Владимир Александрович[✉] — д.м.н., с.н.с., в.н.с. 48 Центрального научно-исследовательского института, Сергиев Посад-6, Россия, vamarkin72@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5996-3985>

Статья поступила в редакцию 28.12.2022;
принята к публикации 02.03.2023;
опубликована 28.04.2023

Information about the author

Vladimir A. Markin[✉] — D. Sci. (Med.), senior researcher, leading researcher, 48 Central Research Institute, Sergiev Posad-6, Russia, vamarkin72@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5996-3985>

The article was submitted 28.12.2022;
accepted for publication 02.03.2023;
published 28.04.2023

Научный обзор
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-198>



Агрегированность *Yersinia pestis* как функциональная адаптация к организму блохи (обзор)

Базанова Л.П.[✉], Никитин А.Я., Токмакова Е.Г.

Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока Роспотребнадзора, Иркутск, Россия

Аннотация

Проблема определения условий и механизмов агрегирования чумного микроба в организме переносчиков — блох — всегда была актуальной, а с конца 1990-х гг. в связи с началом исследований биоплёнок получила новое развитие.

С целью выявления особенностей агрегирования чумного микроба в организме основного переносчика в Тувинском природном очаге — блохи *Citellophilus tesquorum* — проанализированы и обобщены данные многолетних экспериментальных исследований, проведённых с типичными для очага вирулентными штаммами *Yersinia pestis* subsp. *pestis*. Эктопаразитов инфицировали и проводили подкормки на их естественном прокормителе и основном носителе *Y. pestis* в Тувинском очаге — длиннохвостом суслике (*Spermophilus undulatus*). Взаимоотношения *Y. pestis* и блох оценивали по доле особей с конгломератами — «глыбками», сформировавшимися за подкормку, и «блоками» преджелудка за подкормку и за опыт в целом, которые регистрировали визуально в живых блохах после кровососания, а также по частоте передачи возбудителя животным, использованным для подкормок.

Проведённый анализ позволил выявить факторы, влияющие на частоту и динамику формирования различных форм агрегатов *Y. pestis* у *C. tesquorum*, и рассмотреть эти процессы как функциональную адаптацию микроба к организму блохи.

Ключевые слова: обзор, *Yersinia pestis*, агрегированность, блоха, адаптация

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: Базанова Л.П., Никитин А.Я., Токмакова Е.Г. Агрегированность *Yersinia pestis* как функциональная адаптация к организму блохи (обзор). *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(2):240–250.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-198> EDN: <https://www.elibrary.ru/nyppwcz>

Review article
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-198>

The *Yersinia pestis* aggregation as a functional adaptation to the flea organism (review)

Lyubov' P. Bazanova[✉], Aleksey Ya. Nikitin, Elena G. Tokmakova

Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russia

Abstract

The understanding of mechanisms and conditions of plague microbe aggregation in vectors' (fleas) organisms has been of interest for a long time, and, with start of biofilm research in 1990s, it got a new perspectives.

With the aim to determine the characteristics of the plague microbe aggregation in the organism the main vector in Tuva natural plague focus' — flea of *Citellophilus tesquorum* species, the data of many years of experimental studies focused on typical virulent strains of *Yersinia pestis* subsp. *pestis* were summarized and analyzed. Ectoparasites were infected and fed on long-tailed ground squirrel (*Spermophilus undulatus*), which is their natural host and main carrier of plague in Tuva natural plague focus. Interaction between *Y. pestis* and fleas were

estimated using the rate of individuals with conglomerates “bacterial lumps”, formed during feeding, and “blocks” in the proventriculus formed during feeding and throughout the whole experiment registered in alive fleas after bloodsucking, and also using frequency of causative agent transmission to animals used for feeding. The analysis identified factors influencing the frequency and dynamics of different *Y. pestis* aggregate types forming into *C. tesquorum*, and suggest that these processes are functional adaptation of microbe to the flea organism.

Keywords: review, *Yersinia pestis*, aggregation, flea, adaptation

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: Bazanova L.P., Nikitin A.Ya., Tokmakova E.G. The *Yersinia pestis* aggregation as a functional adaptation to the flea organism (review). *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2023;100(2):240–250.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-198> EDN: <https://www.elibrary.ru/nypwcz>

Способность возбудителя чумы к агрегированию в пищеварительном тракте блохи обеспечила становление в процессе эволюции трансмиссивного механизма его распространения [1–5]. Плотные агрегации, формируемые *Yersinia pestis* в средней кишке блохи и блокирующие преджелудок, окружены внеклеточной матрицей (биоплёнкой) [6]. Она защищает возбудителя от защитных реакций беспозвоночных [2] и начального воздействия иммунной системы теплокровных хозяев [3, 7].

Предметом большинства исследований адаптации *Y. pestis* к существованию в блохе-переносчике является «блок» преджелудка, а объектом или эталоном сравнения — блоха *Xenopsylla cheopis*. В организме данной блохи возбудитель чумы чаще проявляется в форме «блоков», а не свободно плавающих, неприкреплённых форм — «глыбок» [8]. В то же время известна точка зрения [9], что бактериальные «глыбки» в желудке блох не служат основой для «блокообразования» в отдалённые от заражения сроки. Такие блохи могут являться своеобразными хранителями микроба, участвовать в заражении шерсти грызуна и гнездовой камеры, обсеменяя окружающую среду живыми бактериями, защищёнными от воздействия неблагоприятных условий внешними мембранными образованиями [3, 10]. На примере блох-переносчиков из сибирских природных очагов чумы нами установлено, что формирование «глыбок» происходило у всех 12 взятых в исследование видов и подвидов этих эктопаразитов, причём различия между активными и неактивными переносчиками по частоте их образования в целом не достоверны [8].

С целью выявления особенностей и условий формирования агрегированных форм («глыбок» и «блоков») *Y. pestis* в организме *Citellophilus tesquorum* — основного переносчика в Тувинском природном очаге (ТПО) [11–14] — проведён анализ и обобщены данные собственных экспериментальных исследований с использованием параме-

трических критериев, без изучения распределения временных рядов. Результаты отдельных экспериментов ранее были опубликованы, однако более полная «расшифровка» механизмов приспособления (адаптации) возбудителя чумы к существованию в организме переносчика (на примере ТПО) стала возможной только при обобщении и анализе многолетних данных.

Динамика эпизоотического процесса в ТПО в основном определяется особенностями взаимодействия жизнедеятельности длиннохвостого суслика (*Spermophilus undulatus*) — основного носителя возбудителя чумы [14, 15] — и блохи *C. tesquorum* [16, 17], являющейся в данном очаге не только основным переносчиком, но и хранителем возбудителя [18]. В последние годы в очаге наблюдаются трансформация паразитоценозов и возрастание эпизоотической активности, связанные в том числе с ростом численности и миграционной активности *C. tesquorum*, происходящими на фоне аридизации климата [14, 19]. В многолетних экспериментах использованы типичные для очага вирулентные штаммы *Y. pestis* subsp. *pestis*. Отличительный признак тувинских изолятов *Y. pestis* — наличие у них в геноме дополнительной четвёртой плазмиды рТР33 с молекулярной массой 22 МДа (~33 т.п.н.) [20]. При анализе функциональных свойств плазмиды рТР33 высказано предположение о том, что она играет роль в процессе колонизации преджелудка блох, обеспечивая большую прочность эктопаразитов инфицированы и проводили подкормки на *S. undulatus*. Частоту и динамику формирования агрегированных форм *Y. pestis* у блох оценивали по доле особей с «блоком» и «глыбками», отмечаемым визуально на фоне алой крови при просмотре под микроскопом живых имаго после каждой подкормки. Подробно методы проведения экспериментальных исследований отражены в опубликованных ранее работах [11, 22–24].

Сезонная динамика агрегирования *Y. pestis*

Во взаимоотношениях чумного микроба и блохи *C. tesquorum* в ТПО проявляется чётко выраженная сезонность, которая обусловлена, вероятнее всего, их длительной коадаптацией [22, 24]. Так, доля особей с «глыбками» осенью резко возрастает к концу эксперимента (3–4 октября): за две последние подкормки выявлены 64,5 и 67,7% таких особей (рис. 1, а). По сравнению со средним за весь опыт показателем ($15,8 \pm 4,6\%$), доля блох с «глыбками» к началу октября увеличилась более чем в 4 раза. В это время имаго заканчивают физиологическую перестройку для переживания зимнего периода в состоянии оцепенения, что, видимо, приводит к изменению взаимодействия микроба с организмом переносчика, возрастанию способности возбудителя к агрегированию. Три первые подкормки после выхода блох из диапаузы весной приходились на 228, 232 и 235-е сутки от заражения. Осенью за последние подкормки выявили в среднем $65,9 \pm 1,43\%$ особей с «глыбками», после перезимовки этих блох за три первых подкормки весной — $45,8 \pm 1,16\%$ (без учёта пола). Таким образом, регистрация агрегатов микроба у «перезимовавших» имаго в весенний период (рис. 1, б) ближе к данным, полученным у этих блох осенью предыдущего года (рис. 1, а). Этот факт позволил предположить, что именно в агрегированном состоянии *Y. pestis* находится в организме *C. tesquorum* весь холодный период года. Об этом может свидетельствовать и существенное различие доли блох, у которых выявляли конгломераты *Y. pestis* за три первые подкормки осенью после заражения (0) и весной после перезимовки ($45,8 \pm 1,16\%$; $t = 19,78$; $p < 0,001$).

Для подтверждения этого предположения проведён сравнительный анализ результатов весеннего (рис. 1, в) и летнего опытов с блохами двух календарных возрастов («перезимовавшими» и «молодыми»). К первым отнесены блохи, инфицированные осенью предыдущего года и перезимовавшие (после проведения 18 подкормок в сентябре–октябре) в состоянии оцепенения без прокормителя. Ко вторым — насекомые выплода и заражения текущего года. Весной у «молодых» блох при их 100% заражённости после 3 первых подкормок доля имаго с «глыбками» была существенно ниже ($0,70 \pm 0,34$), чем среди «перезимовавших» ($45,80 \pm 1,17$; $t = 13,02$; $p < 0,001$), а максимум ($27,6\%$) «молодых» блох с «глыбками» зарегистрирован только на 28-е сутки после заражения (подкормки 7–9; рис. 1, в). Летом (в июне), более чем через 280 сут после заражающего кормления, доля блох с «глыбками» среди «перезимовавших» за первые три подкормки в среднем оставалась стабильно высокой — $45,90 \pm 4,03\%$, а среди «молодых» за тот же период она была значительно ниже — $1,80 \pm 1,82\%$ [24]. Данные факты указывают на возможность сохра-

нения *Y. pestis* в организме имаго *C. tesquorum* в «глыбках» не только на протяжении зимнего периода, но и до нового эпизоотического сезона.

Установлено наличие сезонных изменений частоты «блокообразования» у *C. tesquorum* в экспериментальных условиях [22]. В июле – начале августа, в период активизации эпизоотического процесса в очаге, она достигала максимума — $10,6 \pm 2,4\%$ «блокированных» особей за опыт. В то же время отмечен и минимальный срок (3 сут) от заражения имаго до формирования первого «блока». Осенью (сентябрь) процент «блокирующихся» особей заметно уменьшился и составил $6,00 \pm 1,94\%$, что пришлось на время спада эпизоотии в очаге. Первые после заражения особи с «блоком» выявлены осенью на 7-е сутки. Зимний период значительная часть инфицированных осенью имаго переживает в состоянии оцепенения. Весной среди перезимовавших в экспериментальных условиях блох выявлено менее 2% ($1,7 \pm 0,9\%$) «блокированных». Передачи возбудителя зверькам с активным проявлением инфекционного процесса в этот период не зарегистрировано. В июне, с началом активизации эпизоотического процесса в очаге, в эксперименте возросла как доля особей с «блоком» среди перезимовавших блох — до $4,6 \pm 1,6\%$, так и частота передачи возбудителя чумы, которая была установлена бактериологическим методом у 3 из 10 использованных для подкормок сусликов.

Анализ полученных данных показал, что у *C. tesquorum* наблюдается выраженная сезонная динамика не только частоты и сроков «блокообразования» [24], но и инфекционности укусов «блокированных» особей, частоты передачи инфекции блохами и генерализации инфекционного процесса у заболевших носителей. Необходимо отметить, что максимальные значения всех перечисленных показателей в условиях эксперимента совпадали по времени с пиком активизации эпизоотического процесса в природном очаге.

Влияние пола блохи на агрегированность *Y. pestis*

Предполагалось, что выраженный половой диморфизм у блох должен отражаться на способности к сохранению и распространению *Y. pestis* самками и самцами. По результатам 3 опытов, проведённых в июле–августе (в разные годы), доля «блокированных» самцов *C. tesquorum* в этот период значительно превышала долю самок с «блоком» (рис. 2, а). Половые различия по данному признаку достоверны для показателей всех анализируемых летних опытов (для первого и второго — $p < 0,05$, для третьего — $p < 0,001$). Процесс «блокообразования» у самцов начинался и заканчивался раньше, чем у самок. При этом закономерных половых различий в формировании бактериальных «глыбок» в летний

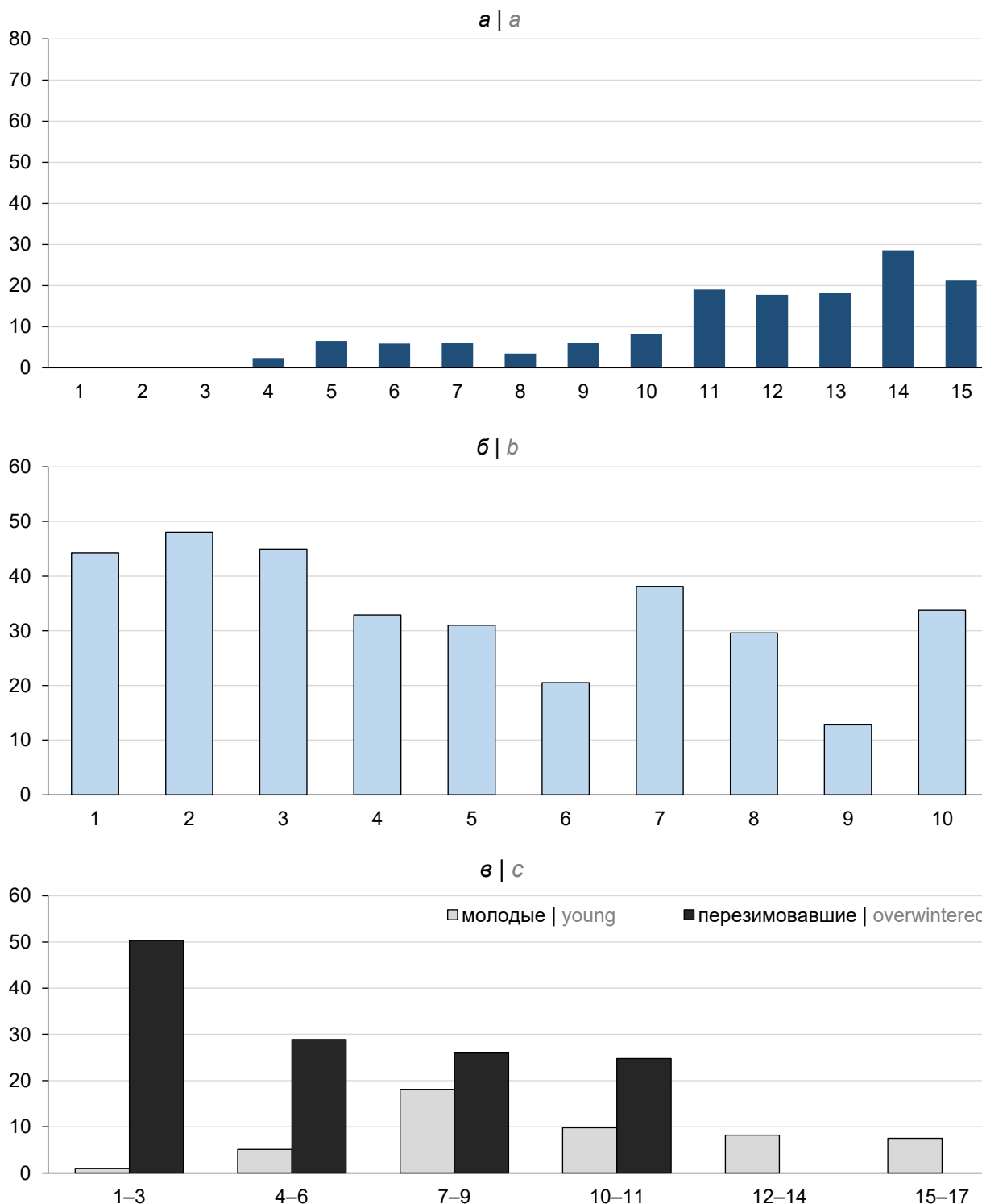


Рис. 1. Сезонные особенности формирования конгломератов чумного микроба у молодых блох *C. tesquorum altaicus* выплода текущего года и перезимовавших в состоянии оцепенения.

а — осень, блохи выплода и заражения текущего года; *б* — весна, перезимовавшие имаго весной следующего года; *в* — весна, результаты параллельно проведённых опытов с имаго, заражёнными непосредственно перед началом эксперимента и перезимовавшими, инфицированными осенью предыдущего года. По осям абсцисс — подкормки, по осям ординат — доля блох с конгломератами чумного микроба за подкормку, %.

Fig. 1. Seasonal features of the formation of conglomerates of the plague microbe in young fleas *C. tesquorum altaicus* breeding this year and overwintered in a state of torpor.

a — autumn, breeding fleas and infestations of the current year; *b* — spring, overwintered adults in the spring of next year; *c* — spring, the results of parallel experiments with adults infected immediately before the start of the experiment, and overwintered, infected in the fall of the previous year. Abscissas — bloodfeedings, ordinates — proportion of fleas with plague microbe conglomerates per bloodfeeding, %.

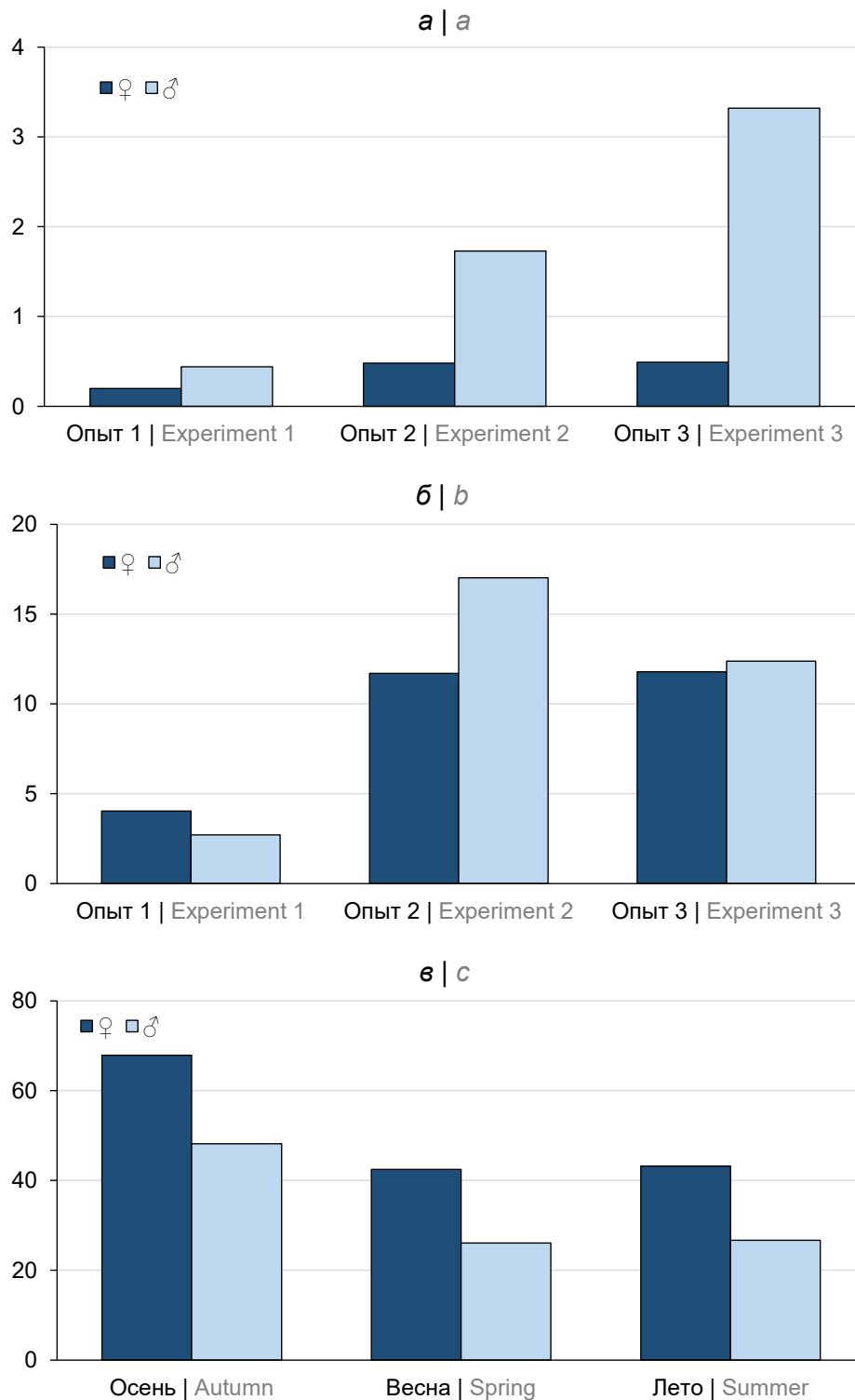


Рис. 2. Различия в накоплении и сохранении чумного микроба в организме самок и самцов *C. tesquorum altaicus*. а — «блокообразование» у самок и самцов в июле–августе; б — формирование бактериальных глыбок у самок и самцов в июле–августе; в — накопление в организме самок и самцов бактериальных глыбок осенью и сохранение их до весны и лета следующего года. а, б: по осям абсцисс — номера опытов, по осям ординат — доля блох с блоками или глыбками, %; в: по оси ординат — доля блох с конгломератами (блоками и глыбками) за подкормку, %.

Fig. 2. Differences in the accumulation and preservation of the plague microbe in the body of females and males of *C. tesquorum altaicus*.

а — block formation in females and males in July–August; б — the formation of bacterial "lumps" in females and males in July–August; в — the accumulation of bacterial "lumps" in the body of females and males in the autumn and their preservation until the spring and summer of the next year. а, б: abscissas — numbers of experiments, ordinates — proportion of fleas with blocks or bacterial lumps per experiment, %; в: ordinate — the proportion of fleas with conglomerates (blocks and bacterial lumps) for bloodfeeding, %.

период не обнаружено (рис. 2, б). Первых самок с «глыбками» *Y. pestis* регистрировали в те же сроки, что и самцов.

Экспериментальные данные показали, что самки лучше переживают неблагоприятный период года. Из всех заражённых осенью имаго до весны следующего года выжило 69,4% самок и 46,9% самцов ($t = 3,5$; $p < 0,001$) [24]. Также выявлены половые различия у блох в накоплении глыбок *Y. pestis* осенью и сохранении их до весны и лета следующего года (рис. 2, в). Так, из инфицированных осенью имаго перед закладкой на зимнее хранение отметили 67,9% самок и 48,1% самцов с глыбками возбудителя ($t = 3,08$; $p < 0,01$). К весне следующего года агрегаты *Y. pestis* содержали 50,0% самок и 23,7% самцов ($t = 2,89$; $p < 0,01$). Эти результаты свидетельствуют о том, что возбудитель чумы переживает неблагоприятный период в агрегированном состоянии в основном в самках *C. tesquorum*. Учитывая лучшую выживаемость самок по сравнению с самцами, следует признать их более значительную роль в сохранении *Y. pestis* в период зимней диапаузы.

Таким образом, экспериментально подтверждена способность чумного микроба к переживанию зимнего периода в блохах, находящихся в состоянии оцепенения без контакта с прокормителем. Более половины имаго сохраняли возбудителя чумы в течение 10–11 мес, а около 30% — 13–15 мес. В организме некоторых самок чумной микроб сохранялся до 22 мес, после чего блохи инфицировали здоровых сусликов при кровососании [24].

Влияние температуры на агрегированность *Y. pestis*

Температурные значения в проведённых нами опытах были приближены к наблюдаемым в природе в ТПО: от 5–6°C в сентябре–октябре (модель периодически посещаемого в этот период летнего гнезда), до 22–25°C в мае–июне (модель выводкового гнезда, в котором создаются оптимальные условия для преимагинальных стадий *C. tesquorum*). Режим подкормок для удобства сравнения унифицировали — через 1–2 сут.

Полученные данные показали, что среди заражённых осенью 150 блох, содержащихся при 5–6°C, на протяжении всех подкормок большинство составляли особи с глыбками, доля которых поступательно увеличивалась до максимума к концу опыта (4 октября). Другие визуализируемые разновидности агрегатов — полные и частичные блоки встречались по сравнению с ними в ничтожно малом количестве: у 0,3% имаго в среднем за подкормку.

Значительно различалась динамика формирования чумным микробом глыбок и блоков в организме *C. tesquorum* при температуре 5–25°C (рис. 3, а, б). Так, при 5–6°C первые самки с «глыбками» отмечены только на 8–10-е сутки, а с «блоками» — на

18-е сутки. У самцов формирование глыбок и блоков началось одновременно с 13-х суток. Образование тех и других агрегированных форм продолжалось у обоих полов до конца опыта — по 32-е сутки. При 8–10°C первые глыбки *Y. pestis* регистрировали как у самок, так и у самцов начиная с 8-х суток, и также до конца опыта (35-е сутки). Период «блокообразования» продолжался у самок с 16-х по 31-е сутки, у самцов — с 8-х по 34-е сутки. При 16–18°C формирование агрегатов возбудителя — как глыбок, так и блоков — у *C. tesquorum* (без учёта пола) наблюдали с 3-х суток до конца опыта (26-е сутки). Дальнейшее повышение температуры до 22–25°C существенно не повлияло на сроки формирования глыбок микроба. Их отмечали начиная с 3-х суток и до конца опыта (30-е сутки) у особей обоих полов. При этом период от заражения блох до начала формирования блоков увеличился по сравнению с показателями, полученными при содержании блох в температурных границах 16–18°C. Так, первые блоки отмечены у самок на 12-е сутки, у самцов — на 7-е, а последние — на 24-е и 16-е сутки соответственно (рис. 3, а). По сравнению с опытом при 16–18°C, сократился и период «блокообразования» (от начала до конца выявления «блокированных» особей) на 8–11 сут. Наибольшее число «блокированных» блох (рис. 3, б) отмечали в диапазоне температур от 8–10 до 16–18°C.

Температура является одним из мощных факторов, воздействующих на взаимоотношения *Y. pestis* и блох. С повышением температуры окружающей среды активность имаго и, в частности, частота кровососания возрастает [25]. В этой связи при питании блохи могут вносить большее количество бактерий. Однако такая зависимость наблюдается только до определённой температуры. В опытах разных исследователей зарегистрированный процент особей *X. cheopis* с блоком при 4°C не превышал 1%, достигал максимума при 13–20°C [26], при более высоких значениях (27°C и выше) снижался, а при 30°C таких особей вообще не выявляли [6]. У *C. tesquorum*, заражённых высоковирулентным штаммом из Волго-Уральского междуречья и подкармливаемых на малом суслике, через 2 сут доля «блокированных» особей была выше, а минимальные и средние сроки образования блоков — короче при температуре опыта 16–18°C по сравнению с содержащимися при 8–10°C [27]. Эксперименты, проведённые с той же периодичностью подкормок при трёх температурных режимах: 4, 13 и 20°C, — показали наибольшее количество «блокированных» блох среди *C. tesquorum*, заражённых «диким» штаммом из Центрального Кавказа, при 13°C, при 4°C таких особей было меньше в 1,5 раза, а при 20°C — в 3,5 раза. В качестве прокормителей в этих опытах были использованы морские свинки и белые мыши [26]. Проведённые ранее исследования

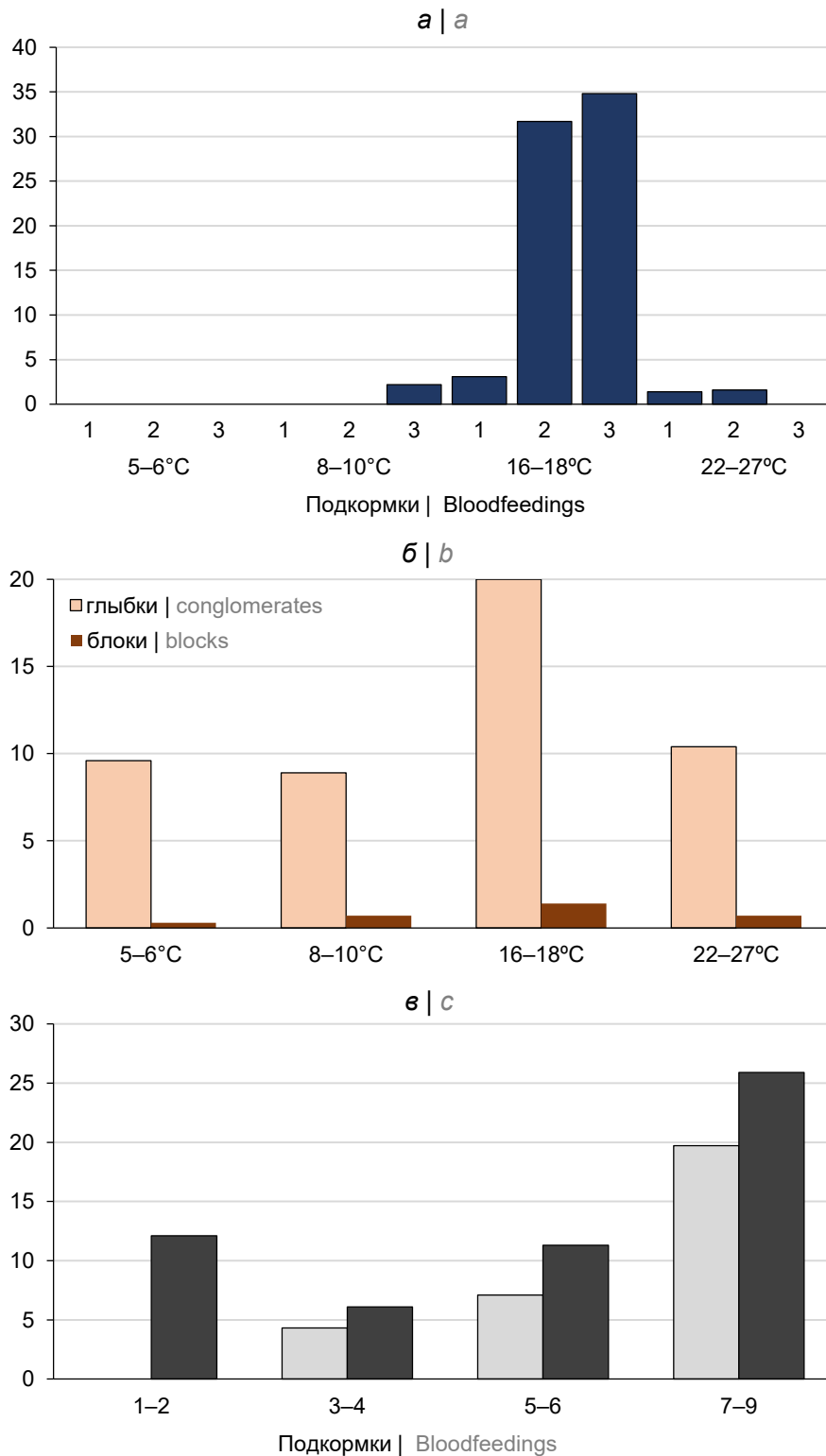


Рис. 3. Формирование конгломератов чумного микроба у *C. tesquorum altaicus* при различных условиях содержания. а — начало формирования глыбок при разной температуре; б — частота формирования конгломератов при разной температуре; в — начало формирования бактериальных глыбок в зависимости от периода между заражающим кормлением блох и периодическими подкормками (серые столбики — 3-и сутки, черные столбики — 16-е сутки). По осям ординат — доля блох с конгломератами чумного микроба, %.

Fig. 3. Formation of conglomerates of the plague microbe in *C. tesquorum altaicus* under various conditions of keeping. а — the beginning of the formation of lumps at different temperatures; б — the frequency of formation of conglomerates at different temperatures; с — the beginning of the formation of bacterial lumps depending on the period between the infectious feeding of fleas and periodic feedings (grey columns — 3rd day, black columns — 16th day). Ordinate — the proportion of fleas with plague microbe conglomerates per bloodfeeding, %.

с *C. tesquorum* из ТПО показали, что образование блока у блох чаще регистрировали при температуре содержания 10°C, чем при 20°C [28].

В наших опытах отмечено влияние температуры содержания блох как на процесс «блокообразования», так и на эффективность трансмиссии возбудителя. Так, имаго, содержащиеся при 22–25°C, передали возбудителя 6 сусликам из 19 (у 2 зверьков выявлена генерализованная форма инфекции). Блохи, находившиеся между подкормками при 16–18°C, инфицировали 5 (50%) сусликов из 10, а при 8–10°C — 4 (52%) из 13, при этом у всех заболевших зверьков и в том и другом опытах отмечена генерализация инфекционного процесса [29].

Таким образом, оптимальной для процесса «блокообразования» у *C. tesquorum* и эффективной передачи *Y. pestis* является температура от 8–10°C до 16–18°C; более низкие или высокие её значения приводят к снижению активности блохи как переносчика. Так, минимальные сроки образования глыбок с ростом температуры сокращались от 8 сут при 5–10°C до 3 сут при 16–25°C [29]. Известно, что оптимум температуры при искусственном культивировании *Y. pestis* — 28°C. Можно сделать вывод, что количество блох с биоплёнками определяется оптимумом температуры для блох, а период роста биоплёнки до её видимого (визуально регистрируемого) состояния имеет тенденцию к сокращению при приближении к оптимуму температуры для бактерии. Хотя условия внутри каждого макроорганизма характеризуются индивидуальностью, в целом можно предположить, что температурный оптимум для возбудителя чумы в блохе имеет более широкие пределы, чем в искусственной среде.

Влияние периодичности кровососания блох на агрегированность *Y. pestis*

Установлено влияние режима питания блох *C. tesquorum* на агрегированность *Y. pestis* в их организме [23]. Имаго после заражения возбудителем чумы осенью разделили на две группы. Насекомых 1-й группы (150 особей) периодически подкармливали на сусликах, между подкормками содержали при 5–6°C: такие условия в осенний период обычны для редко посещаемого сусликом летнего гнезда. Вторую группу блох (более 600 особей) содержали с прокормителем постоянно, что имитировало имеющую место ситуацию, когда молодые суслики пытаются зимовать в летних гнёздах. В 1-й группе на 20-е сутки от заражения (после 18 подкормок) у 64 (66,0%) из 97 оставшихся в живых имаго отмечены глыбки микроба. Доля «блокированных» особей от взятых в опыт составила 6,0%. Во 2-й группе особи с глыбками составили 2,7% от 300 просмотренных блох, что достоверно ниже ($t = 12,9; p < 0,001$), чем в 1-й группе, особи с блоками — 1,7% [23]. По результатам осеннего опыта, условия постоянного

содержания эктопаразитов с прокормителем не благоприятствовали агрегации *Y. pestis*, что указывает на необходимость хотя бы периодического отсутствия зверька для успешной сезонной перестройки микроба в организме блохи.

На следующем этапе проанализированы данные опыта с двумя группами «молодых» блох в летний (июль–август) период (рис. 3, в). Эктопаразитов обеих групп заразили одновременно 22 июля, исходная заражённость составляла 100%. Подкормки одной группы блох начали на 3-и сутки после заражающего кормления, второй — на 16-е сутки. В первой группе особи с глыбками ни при первой, ни при второй подкормке не выявлены. У блох, которых начали кормить на 16-е сутки, доля особей с глыбками при первой же подкормке составила 9,3% среди самок ($t = 3,32; p < 0,001$) и 14,8% среди самцов ($t = 3,75; p < 0,001$). Всего (без учёта пола) блохи с глыбками составили 11,6% ($t = 4,99; p < 0,001$). Представляет интерес, что при дальнейших регулярных подкормках межгрупповые различия нивелировались: средняя доля блох с глыбками в группах существенно не различалась: в первой группе — $15,9 \pm 4,87$, во второй — $15,2 \pm 4,25\%$.

Впервые показано, что, несмотря на увеличение количества имаго с биоплёнками после 16-суточной голодовки среди молодых особей, этого оказалось недостаточно, чтобы приблизиться к показателям у перезимовавших блох. Среди последних доля особей с глыбками за 3 первые подкормки была достоверно выше (для самок $F = 292,41; p < 0,001$; для самцов $F = 93,72; p < 0,001$), чем у молодых имаго.

В естественных условиях *C. tesquorum* нападают на сусликов до 3 раз в сутки [16], и у них часто наблюдаются «прогон» и выделение непереваренной алой крови. Увеличение интервала между подкормками для часто питающихся в норме блох *Ctenocephalides felis* от 2 ч (практически постоянный доступ к прокормителю) до 2–3 сут приводило к повышению доли «блокированных» блох с 0 до 15,2% [30]. Повышение частоты «блокообразования» *Y. pestis* при недостатке питательных веществ связывают с усилением транскрипции в блохе гена *ompF*, продукт которого — белок-порин может обеспечивать, с одной стороны, приток в бактериальную клетку дополнительного питания, а с другой — экспорт молекул-компонентов внеклеточного матрикса биоплёнки [31]. В то же время в группах *C. tesquorum*, содержащихся при 13°C и разных режимах кормления — через 2–3 и 15–20 сут, количество «блокированных» блох практически не различалось, составив 14 и 12% соответственно. Первые блохи были отмечены на 18-е сутки у блох, подкармливаемых через 2–3 сут, и на 30-е сутки при подкормках через 15–20 сут [26], но на срок обнару-

жения во втором случае, очевидно, повлиял режим подкормок. Насколько он соответствовал реальному сроку образования закупорки преджелудка, неизвестно. В наших опытах двухнедельное голодание *C. tesquorum* после заражения также не привело к повышению доли «блокированных» особей, по сравнению с периодически подкармливаемыми, как среди самок — 3,7% против 5,4%, так и среди самцов — 24,7% против 13,9% ($t = 1,85$; $p > 0,05$). Однако необходимо подчеркнуть, что соотношение различных форм биоплёнки (глыбок и блоков) зависит от вида блох. У *C. tesquorum* первые всегда обнаруживали чаще, чем вторые [8], и на фоне отсутствия доступа блох к прокормителю после заражения имело место накопление именно особей с глыбками. В приведённых экспериментах частота питания блох регулировалась искусственно. В то же время, по наблюдениям, проведенным в ТПО, блохи *C. tesquorum* осенью перестают интенсивно питаться, их численность в шерсти зверьков падает, а в гнездах длиннохвостого суслика возрастает [16]. Возможно, естественное снижение частоты питания является дополнительным стимулом для формирования агрегатов чумного микроба.

Морфология бактерий *Y. pestis* в глыбках и блоках

В.Ж. Hinnebusch и соавт. наблюдали зависимость морфологии клеток в микроколониях, обнаруживаемых в средней кишке блох *X. cheopis*, от температуры: от палочковидной при 20°C до кокковидной при 30°C [6]. У *C. tesquorum* после переизморозки в разных агрегациях (блоки, глыбки) выявлено различие морфологических форм *Y. pestis*. В глыбках прослеживается полиморфизм клеток чумного микроба, отмечены палочковидные, гантелевидные и шаровидные формы. В блоках отмечены только шаровидные очень мелкие (0,2–0,5 мкм), бледно окрашенные формы бактерий, которые, по данным электронно-микроскопического анализа, отличались, кроме того, своеобразной ультраструктурой, включающей дополнительные мембранные образования [23]. Возможно, отличающаяся морфология микробных клеток в глыбках и блоках обусловлена работой различных генов через кодируемые ими ферменты. На то, что образование глыбок и образование блоков — это два разных процесса, указывают результаты оценки влияния разных факторов на формирование биоплёнки: первое регулируется условиями эксперимента (температурой, сезоном, режимом подкормок), второе — преимущественно полом блох [32]. Известно также, что контроль образования биоплёнки осуществляется двумя дигуанилатциклазами. Одна из них контролируется локусом *hmsD* и отвечает за большую часть блоков (до 90%) *in vivo*, отсутствие второй, продукта *hmsT*, приводит к нарушению синтеза биоплёнки

in vitro. Её изолированная способность в формировании блока у блох незначительна, но определённая усиливающая роль очевидна [33]. Последними исследованиями подтверждено, что вклад этих ферментов в «блокообразование» у штаммов, относящихся к разным биоарам, идентичен [34, 35].

Заключение

Таким образом, можно заключить, что формирование глыбок *Y. pestis* является не только начальной стадией «блокообразования», но и самостоятельным явлением [8, 32], отражающим адаптацию микроба к меняющимся условиям обитания в организме переносчика. Во-первых, данный вывод подтверждается анализом экспериментальных данных, свидетельствующих о том, что все изменения физиологического состояния блох (подготовка к зимней диапаузе, длительное голодание, изменение температуры содержания и режима подкормок) способствуют агрегированности чумного микроба и в этой связи приводят к повышению доли насекомых с бактериальными глыбками.

Во-вторых, возбудитель чумы в агрегированном состоянии может сохраняться в организме оцепеневших блох, в основном самок, не только до следующего эпизоотического сезона, но и более длительный период. Имеются данные о переживании заражёнными самками *C. tesquorum* двух зимних периодов [24]. Видимо, адаптация микроба к сохранению в самках блох обусловлена большей устойчивостью этого пола к неблагоприятным условиям окружающей среды и продолжительностью их индивидуальной жизни. Процессы распространения (трансмиссивной передачи) и сохранения (персистенции) *Y. pestis* блохами определяются полом насекомых: первый лучше осуществляется самцами, второй — самками. В период активизации эпизоотического процесса в очаге «блокообразование» происходит более интенсивно, чем весной и осенью. В то же время экспериментально доказано, что для сохранения *Y. pestis* в зимний период важно, чтобы размножение и агрегация микроба у *C. tesquorum* осенью не заканчивались массовым формированием блоков, а приводило к накоплению бактериальных глыбок.

В-третьих, различие морфологии *Y. pestis* в глыбках и блоках может обуславливать и разные функциональные особенности возбудителя в этих формированиях. «Блокированные» *C. tesquorum* имеют более существенное значение для распространения *Y. pestis*, т.к. их укусы чаще вызывают генерализованную форму инфекции у зверьков, что приводит к дальнейшей трансмиссии возбудителя [11]. Сформировавшиеся глыбки являются основной формой в сохранении чумного микроба в организме блох [23], а значит, в поддержании энзоотии чумы на территории ТПО.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Брюханова Г.Д., Бейер А.П., Грижебовский Г.М. и др. Значение агрегированности чумного микроба в передаче его блохами. *Медицинская паразитология и паразитарная болезнь*. 1999;3:37–40. Bryukhanova G.D., Beyer A.P., Grizhebovskiy G.M., et al. Contribution of aggregation of plague microbe to its flea transmission. *Medical Parasitology and Parasitic Diseases*. 1999;3:37–40.
2. Jarrett C.O., Deak E., Isherwood K.E., et al. Transmission of *Yersinia pestis* from an infectious biofilm in the flea vector. *J. Infect. Dis.* 2004;190(4):783–92. DOI: <https://doi.org/10.1086/422695>
3. Кутырев В.В., Коннов Н.П., Волков Ю.П. *Возбудитель чумы: ультраструктура и локализация в переносчике*. М.; 2007. Kutyrev V.V., Konnov N.P., Volkov Yu.P. *Plague Causative Agent: Ultrastructure and Localization in the Vector*. Moscow; 2007. EDN: <https://elibrary.ru/qlpmjv>
4. Hinnebusch B.J., Chouikha I., Sun Y.C. Ecological opportunity, evolution, and the emergence of flea-borne plague. *Infect. Immun.* 2016;84(7):1932–40. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.00188-16>
5. Hinnebusch B.J., Jarrett C.O., Bland D.M. “Fleaing” the plague: adaptations of *Yersinia pestis* to its insect vector that lead to transmission. *Annu. Rev. Microbiol.* 2017;71:215–32. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093521>
6. Hinnebusch B.J., Ficher E.R., Schwan T.G. Evaluation of the role *Yersinia pestis* plasminogen activator and other plasmid-encoded factors in temperature-dependent blockage of the flea. *J. Infect. Diseases.* 1998;178(5):1406–15. DOI: <https://doi.org/10.1086/314456>
7. Donlan R.M., Costerton J.M. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002;15(2):167–93. DOI: <https://doi.org/10.1128/cmr.15.2.167-193.2002>
8. Базанова Л.П., Никитин А.Я. Агрегированность чумного микроба в организме блох с различной векторной способностью. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2012;(4):15–7. Bazanova L.P., Nikitin A.Ya. Plague microbe aggregation in the organism of fleas (Siphonaptera) with different vector ability. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2012;(4):15–7. EDN: <https://elibrary.ru/pmdkqcd>
9. Кондрашкина К.И. Болеют ли блохи чумой? *Проблемы особо опасных инфекций*. 1969;5:212–22. Kondrashkhina K.I. Do fleas suffer from the plague? *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 1969;5:212–22.
10. Кутырев В.В., Ерошенко Г.А., Попов Н.В. и др. Молекулярные основы взаимодействия возбудителя чумы с беспозвоночными животными. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2009;4:6–13. Kutyrev V.V., Eroschenko G.A., Popov N.V., et al. Molecular mechanisms of the plague pathogenic agent interaction with invertebrates. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2009;4:6–13. EDN: <https://elibrary.ru/lajqip>
11. Базанова Л.П., Токмакова Е.Г., Маевский М.П. Значение блокированных и неблокированных блох *Citellophilus tesquorum altaicus* (Ioff, 1936) в передаче чумной инфекции. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2003;86:14–20. Bazanova L.P., Tokmakova E.G., Maevskiy M.P. The role of blocked and unblocked fleas *Citellophilus tesquorum altaicus* (Ioff, 1936) in transmission of plague infection. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2003;86:14–20.
12. Вержуцкий Д.Б., Галацевич Н.Ф., Ковалева Н.И. и др. Аннотированный список видов блох, инфицированных возбудителем чумы в Тувинском природном очаге. *Байкальский зоологический журнал*. 2016;(2):121–5. Verzhutskiy D.B., Galatsevich N.F., Kovaleva N.I., et al. The annotated list of infected plague pathogen fleas species in the Tuva natural foci. *Baikal Zoological Journal*. 2016;(2):121–5. EDN: <https://elibrary.ru/ynfjhl>
13. Воронова Г.А. *Ceratophyllus tesquorum altaicus* Ioff 1936 как основной переносчик и хранитель чумного микроба в Тувинском природном очаге. В кн.: *Эпидемиология и профилактика особо опасных инфекций в МНР и СССР*. Улан-Батор; 1978:152–5. Voronova G.I. *Ceratophyllus tesquorum altaicus* Ioff 1936 as the main vector and keeper of the plague microbe in the Tuva natural focus. In: *Epidemiology and prevention of particularly dangerous infections in the MPR and the USSR*. Ulan-Bator; 1978:152–5.
14. Балахонов С.В., Вержуцкий Д.Б., ред. *Тувинский природный очаг чумы*. Иркутск; 2019. Balakhonov S.V., Verzhutskiy D.B., eds. *Tuva Natural Plague Focus*. Irkutsk; 2019.
15. Вержуцкий Д.Б., Базанова Л.П., Вержуцкая Ю.А. Эпизоотологическое значение массовых видов блох длиннохвостого суслика в природных очагах чумы. *Байкальский зоологический журнал*. 2020;(2):105–9. Verzhutskiy D.B., Bazanova L.P., Verzhutskaya Yu.A. Epizootological significance of fleas — common parasites of longtailed ground squirrels in natural plague foci. *Baikal Zoological Journal*. 2020;(2):105–9. EDN: <https://elibrary.ru/fyaafl>
16. Крюков И.Л. Взаимосвязь сезонной жизнедеятельности длиннохвостого суслика и блохи *Ceratophyllus tesquorum*. В кн.: *Современные аспекты профилактики зоонозных инфекций*. Иркутск; 1984:85–7. Kryukov I.L. The relationship between the seasonal activity of the long-tailed ground squirrel and the flea *Ceratophyllus tesquorum*. In: *Current Aspects of the Prevention of Zoonotic Infections*. Irkutsk; 1984:85–7.
17. Вержуцкий Д.Б., Зонов Г.Б., Попов В.В. Эпизоотологическое значение накопления блох в агрегациях самок длиннохвостого суслика в Тувинском природном очаге чумы. *Паразитология*. 1990;24(3):186–92. Verzhutskiy D.B., Zonov G.B., Popov V.V. Epizootological role of fleas accumulation in aggregations of females of long-tailed susolic in the Tuva plague focus. *Parasitology*. 1990;24(3):186–92. (in Russian)
18. Вержуцкий Д.Б., Ткаченко В.А., Попов В.В., Колосов В.М. О сохранении возбудителя чумы в Тувинском природном очаге. *Журнал инфекционной патологии*. 2003;10(4):31–2.
19. Verzhutskiy D.B., Tkachenko V.A., Popov V.V., Kolosov V.M. On the preservation of the causative agent of the plague in the Tuva natural focus. *Journal of Infectious Pathology*. 2003; 10(3):31–2.
20. Вержуцкий Д.Б., Холин А.В., Климов В.Т. и др. Эпизоотическая активность Тувинского очага чумы и ее особенности на современном этапе. В кн.: *Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных*. Ставрополь; 2017:14–6. Verzhutskiy D.B., Kholin A.V., Klimov V.T., et al. Epizootic activity of the Tuva plague focus and its features at the present stage. In: *Actual Problems of Diseases Common to Humans and Animals: Materials of the All-Russian Scientific and Practical Conference*. Stavropol'; 2017:14–6.
21. Балахонов С.В. Результаты скрининга плазмид штаммов *Yersinia pestis* из разных очагов Центральноазиатской зоны природной очаговости. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 1989;4:39–42. Balakhonov S.V. Results of plasmid screening of *Yersinia pestis* strains isolated from different focuses in central Asian zone of plague natural focality. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 1989;4:39–42.
22. Афанасьев М.В., Балахонов С.В., Токмакова Е.Г. и др. Анализ нуклеотидной последовательности криптической плазмиды рTP33 *Yersinia pestis* из Тувинского природного очага чумы. *Генетика*. 2016; 52(9):1012–20. Afanas'ev M.V., Balakhonov S.V., Tokmakova E.G., et al. Analysis of Complete sequence of cryptic plasmid рTP33 from *Yersinia pestis* isolated in Tuva natural focus of plague. *Russian Journal of Genetics*. 2016;52(9):899–906. DOI: <https://doi.org/10.1134/S1022795416090027> EDN: <https://elibrary.ru/xfhuvn>
23. Базанова Л.П., Жовтый И.Ф., Маевский М.П., Климов В.Т., Попков А.Ф. Сезонная динамика блокообразования у блохи *Citellophilus tesquorum altaicus* из Тувинско-

- го природного очага чумы. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 1991;(1):24–6. Bazanova L.P., Zhovtyu I.F., Maevskiy M.P., Klimov V.T., Popkov A.F. The seasonal dynamics of blocking in the flea *Citellophorus tesquorum altaicus* from the Tuva natural plague focus. *Medical Parasitology and Parasitic Diseases*. 1991;(1):24–6.
24. Маевский М.П., Базанова Л.П., Коннов Н.П. и др. Изменчивость *Yersinia pestis* в организме блохи. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1994;71(3):16–21. Maevskiy M.P., Bazanova L.P., Konnov N.P., et al. Variability of *Yersinia pestis* in the body of fleas. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 1994;71(3):16–21.
 25. Базанова Л.П., Никитин А.Я., Маевский М.П. Сохранение возбудителя чумы в зимний период самками и самцами *Citellophilus tesquorum altaicus*. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2007;4:34–6. Bazanova L.P., Nikitin A.Ya., Maevskiy M.P. Conservation of *Yersinia pestis* in winter by *Citellophilus tesquorum altaicus* females and males. *Medical Parasitology and Parasitic Diseases*. 2007;4:34–6. EDN: <https://elibrary.ru/iizrgf>
 26. Бибикина В.А., Класовский Л.Н. *Передача чумы блохами*. М.; 1974. Bibikova V.A., Klassovskiy L.N. *Plague Transmission by Fleas*. Moscow; 1974.
 27. Осипова С.П., Ёлкин Ю.М., Розанова Г.Н. О роли *Ceratophyllus tesquorum* в поддержании энзоотии чумы на Кавказе. В кн.: *Особо опасные инфекции на Кавказе: Тезисы докладов IV Краевой научно-практической конференции по природной очаговости, эпидемиологии и профилактики особо опасных инфекционных болезней*. Ставрополь; 1978:247–50. Osipova S.P., Yolkin Yu.M., Pozanova G.N. On the role of *Ceratophyllus tesquorum* in the maintenance of plague enzootia in the Caucasus. In: *Particularly Dangerous Infections in the Caucasus: Proceedings of the IV Regional Scientific-Practical Conference on Natural Focality, Epidemiology and Prevention of Especially Dangerous Infectious*. Stavropol'; 1978:247–50.
 28. Гражданов А.К., Жаринова Л.К., Кожамкулов Е.У. О влиянии возбудителя чумы на продолжительность жизни блох *Ceratophyllus tesquorum*. В кн.: *Материалы VII научной конференции противочумных учреждений Средней Азии и Казахстана*. Алма-Ата; 1971:113–4. Grazhdanov A.K., Zharinova L.K., Kozhamkulov E.U. On the effect of the plague pathogen on the life expectancy of fleas *Ceratophyllus tesquorum*. In: *Proceedings of the VII Scientific Conference of Anti-Plague Institutions of Central Asia and Kazakhstan*. Alma-Ata; 1971:113–4.
 29. Воронова Г.А., Крюков И.Л. Влияние температуры и условий питания на блохобразование и сохранение чумного микроба в блохах *Ceratophyllus tesquorum altaicus* Ioff. В кн.: *Международные и национальные аспекты эпиднадзора при чуме: материалы международной научной конференции*. Часть 2. Иркутск; 1975:98–102. Voronova G.A., Kryukov I.L. The influence of temperature and food conditions on the block formation and preservation of the plague microbe in fleas *Ceratophyllus tesquorum altaicus* Ioff. In: *International and National Aspects of Plague Surveillance: Proceedings of the International Scientific Conference. Part 2*. Irkutsk; 1975:98–102
 30. Базанова Л.П., Никитин А.Я., Галацевич Н.Ф. Влияние температурного фактора на векторную способность блохи *Citellophilus tesquorum altaicus*. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2003;(3):24–7. Bazanova L.P., Nikitin A.Ya., Galatsevich N.F. Influence of a temperature factor on the vector capacity of the flea *Citellophilus tesquorum altaicus*. *Medical Parasitology and Parasitic Diseases*. 2003;(3):24–7.
 31. Bland D.M., Hinnebusch B.J. Feeding behavior modulates biofilm-mediated transmission of *Yersinia pestis* by the cat flea, *Ctenocephalides felis*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016;10(2):e0004413. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004413>
 32. Bontemps-Gallo S., Fernandez M., Dewitte A., et al. Nutrient depletion may trigger the *Yersinia pestis* OmpR-EnvZ regulatory system to promote flea-borne plague transmission. *Mol. Microbiol.* 2019;112(5):1471–82. DOI: <https://doi.org/10.1111/mmi.14372>
 33. Базанова Л.П., Токмакова Е.Г. Влияние условий опыта на формирование биопленки у чумного микроба в организме блохи *Citellophilus tesquorum altaicus*. In: *21st International Scientific Conference "Current Issues on Zoonotic Diseases"*. Улан-Батор; 2015:85–91. Bazanova L.P., Tokmakova E.G. The impact of experimental conditions on plague microbe's biofilm formation in organism of flea *Citellophilus tesquorum altaicus*. In: *21st International Scientific Conference "Current Issues on Zoonotic Diseases"*. Ulaanbaatar; 2015:85–91.
 34. Sun Y.C., Koumoutsis A., Jarrett C., et al. Differential control of *Yersinia pestis* biofilm formation *in vitro* and in the flea vector by two c-di-GMP diguanylate cyclases. *PLoS One*. 2011;6(4):e19267. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019267>
 35. Lemon A., Sagawa J., Gravelle K., Vadyvaloo V. Biovar related differences apparent in the flea foregut colonization phenotype of distinct *Yersinia pestis* strains do not impact transmission efficiency. *Parasit. Vectors*. 2020;13(1):335. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04207-x>

Информация об авторах

Базанова Любовь Петровна — д.б.н., в.н.с. зоолого-паразитологического отдела Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока, Иркутск, Россия, adm@chumin.irkutsk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8086-98-86>

Никитин Алексей Яковлевич — д.б.н., в.н.с. зоолого-паразитологического отдела Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока, Иркутск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3918-7832>

Токмакова Елена Геннадьевна — к.б.н., с.н.с. зоолого-паразитологического отдела Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока, Иркутск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3416-6602>

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 30.11.2022;
принята к публикации 13.02.2023;
опубликована 28.04.2023

Information about the authors

Lyubov' P. Bazanova — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Zoological and parasitological department, Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russia, adm@chumin.irkutsk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8086-98-86>;

Aleksey Ya. Nikitin — leading researcher, Zoological and parasitological department, Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3918-7832>

Elena G. Tokmakova — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Zoological and parasitological department, Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3416-6602>

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 30.11.2022;
accepted for publication 13.02.2023;
published 28.04.2023



Памяти Николая Николаевича Носика (7 апреля 1932 года – 19 марта 2023 года)



19 марта 2023 г. ушёл из жизни руководитель отдела репродукции вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России доктор медицинских наук, профессор Николай Николаевич Носик.

Н.Н. Носик — известный учёный в области вирусологии, автор более 280 опубликованных научных работ в России и за рубежом, ряда патентов и монографий.

Научные исследования Н.Н. Носика посвящены профилактике и лечению вирусных инфекций. Проведённые им исследования по проблеме интерферонов и их индукторов легли в основу нового направления в разработке противовирусных препаратов с широким спектром активности. В результате этих исследований были созданы и внедрены такие активные противовирусные препараты, как ридостин, ларифан, амиксин и ряд других.

В последние годы Н.Н. Носик руководил исследованиями по разработке и изучению дезинфицирующих вирулицидных средств, активно участвовал в создании современной нормативной документации для оценки вирулицидной эффективности биоцидов.

Н.Н. Носик достойно представлял отечественную медицинскую вирусологию за рубежом, работая в научных лабораториях США, Франции и Китая. В период работы советником по вирусологии в

Региональном бюро Всемирной организации здравоохранения для Юго-Восточной Азии Н.Н. Носик создал вирусологическую лабораторию в Национальном институте инфекционных болезней в Дели (Индия), координировал и проводил эпидемиологические и вирусологические исследования во многих странах региона — от Непала до Мьянмы.

Все 67 лет научной жизни Н.Н. Носика связаны с Институтом вирусологии, в который он пришёл аспирантом в 1956 г. после окончания с отличием Первого Московского медицинского института им. И.М. Сеченова. После защиты в 1960 г. диссертации на степень кандидата медицинских наук работал в должности младшего научного сотрудника, затем старшего научного сотрудника. С 1988 г. являлся руководителем лаборатории онтогенеза вирусов и руководителем отдела репродукции вирусов, членом Учёного совета Института вирусологии им. Д.И. Ивановского. Под руководством Н.Н. Носика подготовлено 7 кандидатов наук.

Н.Н. Носик награждён медалью «За заслуги перед отечественным здравоохранением», знаком «Отличник здравоохранения», являлся почётным членом Национального союза «Медико-биологическая защита».

Н.Н. Носик активно участвовал в общественной жизни института, являясь в разные годы редактором стенгазеты, членом команды КВН, председа-

телем научно-производственной комиссии Группы народного контроля и более 25 лет избирался председателем профсоюзного комитета института, всегда и везде отстаивая интересы его сотрудников.

Многолетнюю научную творческую деятельность Н.Н. Носика всегда отличали высокая принципиальность и требовательность к качеству проводимых исследований, о чём свидетельствовал заслуженный авторитет в научном мире и у сотрудников института.

Выдающийся учёный, дипломат, активный гражданин, энергичный организатор, общительный, улыбчивый, с огромным чувством юмора, поэт, прозаик и художник, замечательный друг и

отец — таким мы запоем этого замечательного человека.

Вот несколько строк, сказанных им:

Дни рождения, как вёрсты,

Стоят на жизненном пути.

Как долог путь,

Лишь знают звёзды,

И как с достоинством пройти.

Всего несколько дней не дожил Николай Николаевич Носик до своего 91-летия.

Свой жизненный путь он прошёл с большим достоинством.

Память об этом выдающемся человеке сохранится в сердцах всех, кто был с ним знаком.

*Коллеги, редакционная коллегия
и редакция «Журнала микробиологии,
эпидемиологии и иммунобиологии*