

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 лечения 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 рекомендованный ВАК «Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук» по специальностям:

03.02.02 Вирусология (медицинские и биологические науки);
03.02.03 Микробиология (медицинские и биологические науки);
14.02.02 Эпидемиология (медицинские и биологические науки);
14.03.09 Клиническая иммунология, аллергология (медицинские и биологические науки)

6

НОЯБРЬ – ДЕКАБРЬ

**ТОМ 97
2020**

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: 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 информиро-
вания читателей об изменениях
в опубликованных статьях.

Статьи иностранных авторов,
а также отдельно рекомендованные
Редакционной коллегией русскоязыч-
ные статьи публикуются на русском
и английском языках под единым DOI.

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

Russian Science Citation Index
(RSCI), интегрированная с платфор-
мой Web of Science; DOAJ; ROAD;
EBSCO Publishing (на платформе
EBSCOhost).

ПОДПИСКА:

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

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

[https://www.microbiol.elpub.ru/](https://www.microbiol.elpub.ru;);

[https://www.elibrary.ru/](https://www.elibrary.ru;);

[https://www.cyberleninka.ru/](https://www.cyberleninka.ru;);

<https://www.rucont.ru/>;

<https://www.ebsco.com.>

ИЗДАТЕЛЬ:

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

111123, Москва,

ул. Новогиреевская, д. 3А.

Тел.: +7(495) 974-96-46.

E-mail: crie@pcr.ru

РЕДАКЦИЯ:

105064 г. Москва,

Малый Казенный пер., д. 5А.

Тел.: +7(925)011-87-79.

E-mail: jmei@crie.ru

*Начальник редакционно-
издательского отдела:*

Осокина Ольга Владимировна

Заведующая редакцией:

Устинкова Ольга Владимировна

Редакция не несет ответственности
за содержание рекламных
материалов.

К публикации принимаются только
статьи, подготовленные в соответ-
ствии с правилами для авторов
(см. www.microbiol.elpub.ru).

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

Подписано в печать 24.12.2020.
Формат 60×90^{1/8}. Тираж 280 экз.
Усл.-печ. л. 6,5.

Отпечатано в типографии
«Буки Веди». www.bukivedi.com.
E-mail: info@bukivedi.com.

© ФБУН ЦНИИ эпидемиологии
Роспотребнадзора, 2020

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

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

Заместитель главного редактора

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

Ответственный секретарь

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Российские члены редакционной коллегии

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

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

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

Бухарин О.В., д.м.н., проф., академик РАН, главный научный сотрудник, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН, Оренбург

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

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

Жирнов О.П., д.б.н., проф., чл.-корр. РАН, зав. лабораторией вирусного патогенеза Института вирусологии им. Д.И. Иванковского, ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва

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

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

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

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

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

Иностранные члены редакционной коллегии

Shubhada Vopengamage, PhD, MSc, Professor, Institute of Microbiology, Slovak Medical University, Bratislava, Slovak Republic

Elena A. Govorkova, MD, PhD, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, USA

Helmut Hahn, MD, PhD, Professor, Vice-president of the European Academy of Natural Sciences, President of the R. Koch Medical Society (Germany), Chairman of German-Russian Koch-Mechnikov Forum, Berlin, Germany

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Игнатьев Г.М., д.м.н., проф., зам. рук. направления качества и инновационных разработок ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова» РАН, Москва, Россия

Кюрегян К.К., д.б.н., проф., зав. отделом изучения вирусных гепатитов НИИ молекулярной и персонализированной медицины ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования», 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

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

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

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

Покровский В.И., д.м.н., проф., академик РАН, советник директора ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

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

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

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

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

Урываев Л.В., д.м.н., проф., чл.-корр. РАН, заместитель директора Института вирусологии им. Д.И. Иванковского, ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва

Филатов Н.Н., д.м.н., проф., чл.-корр. РАН, заместитель директора, НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва

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

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

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

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

Murad K. Mamadov, MD, DSc, Professor, National Oncology Center of the Ministry of Health of the Republic of Azerbaijan, Baku, Republic of Azerbaijan

Мефед К.М., к.б.н., зам. генерального директора по трансферу лекарственных средств, ООО «БиоИнтегратор», группа компаний «ХимФАР», Москва, Россия

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

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

Шендеров Б.А., д.м.н., проф., Проблемная научно-исследовательская лаборатория «Конструирование и внедрение продуктов и рационов персонализированного питания» Московский государственный университет технологий им. К.Г. Разумовского, Москва, Россия

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

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

Bimonthly scientific and practical journal

Founded in 1924

Peer-reviewed Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology is dedicated to the most significant issues of world science and provides a synthesis of the cutting edge research in the field of microbiology, virology, epidemiology, vaccinology, immunobiology, prevention of infectious diseases.

The journal accepts for publication Russian and foreign research papers, lectures, methodological materials, legislative documents in the field of preserving the epidemiological well-being of the population.

The interdisciplinary approach enables the reader to integrate advanced scientific knowledge of related specialties, to receive a broad vision of the problems of fundamental and applied infectology and a comprehensive approach to creating innovative biomedical technologies.

The journal is admitted to the Index of leading peer-reviewed scientific journals intended for publication of key research results of MD Theses, as recommended by the Higher Attestation Commission of the Russian Ministry of Education and Science:

03.02.02 Virology (medical and biological sciences);
03.02.03 Microbiology (medical and biological sciences);
14.02.02 Epidemiology (medical and biological sciences);
14.03.09 Clinical immunology, Allergology (medical and sciences)

6

NOVEMBER – DECEMBER

VOLUME 97

2020

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

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

DOI: 10.36233

The journal is a 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.

Articles by foreign authors, as well as Russian-language articles specially recommended by the Editorial Board, are published in Russian and English under the same DOI.

The journal is presented in the following research databases: Russian Science Citation Index (RSCI) database, integrated in Web of Science; DOAJ; ROAD; EBSCO Publishing (on the EBSCOhost platform).

Index for subscription to the printed version of the journal: United directory. Press of Russia. Newspapers and magazines: E71436, 71436.

Full texts of issues of the journal are available:

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

PUBLISHER:

Central Research Institute of Epidemiology, 11123, 3A, Novogireevskaya St., Moscow, Russian Federation.
Phone/fax: +7(495) 974-96-46.
E-mail: crie@pcr.ru

EDITORIAL OFFICE:

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

Head of the Editorial and publishing department:

Olga V. Osokina

Head of Editorial Office:

Olga V. Ustinkova

The Editorial Board is not responsible for the advertising content.

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

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

Signed to the press on December 24, 2020.
Print format 60×90^{1/8}.
Circulation 250 copies.

Printed at the Buki Vedi Ltd. 115093, 1, 1st Party lane, Moscow, Russian Federation.
E-mail: info@bukivedi.com.
www.bukivedi.com

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), Head, Laboratory of Zoonoses, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

EDITORIAL BOARD

Russian members of the Editorial Board

Vasily G. Akimkin, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow

Nikolay I. Briko, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director, Institute of Public Health, Head, Department of Epidemiology and Evidence-Based Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow

Elena B. Brusina, professor, Dr. Sci. (Medicine), Head, Department of epidemiology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo

Oleg V. Bukharin, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Principal Research Scientist, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis Ural Branch of RAS, Orenburg

Aleksandr L. Gintsburg, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Biology), Director, N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow,

Alexandr V. Gorelov, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Deputy Director for Scientific Research, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow

Oleg P. Zhirnov, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Biology), Head, Laboratory of viral pathogenesis, N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow

Alexander V. Karaulov, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Head, Department of Clinical Immunology and Allergology, Institute of Clinical Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow

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

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

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

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

Foreign members of the Editorial Board

Shubhada Bopagama, PhD, MSc, Professor, Institute of Microbiology, Slovak Medical University, Bratislava, Slovak Republic

Elena A. Govorkova, MD, PhD, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, USA

Helmut Hahn, MD, PhD, Professor, Vice-president of the European Academy of Natural Sciences, President of the R. Koch Medical Society (Germany), Chairman of German-Russian Koch-Mechnikov Forum, Berlin, Germany

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

EDITORIAL COUNCIL

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

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

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

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

Valentin I. Pokrovskiy, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Advisor to Director of Innovation, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow

Oxana A. Svitich, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow

Vladimir P. Sergiev, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director Emeritus, Martsinovskiy Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector-Borne Diseases, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow

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

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

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

Leonid V. Uryvaev, Dr. Sci. (Medicine), Professor, RAS Corr. Member, Deputy Director, D.I. Ivanovskiy Virology Institute, N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow

Nikolay N. Filatov, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Deputy Director for Science, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow

Sergey V. Cherkasov, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch of RAS, Orenburg

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

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

Murad K. Mamadov, MD, DSc, Professor, National Oncology Center of the Ministry of Health of the Republic of Azerbaijan, Baku, Republic of Azerbaijan

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

Boris A. Shenderov, Dr. Sci. (Medicine), Professor, K.G. Razumovskiy Moscow State University of Technology, Moscow, Russia

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Сперанская А.С., Каптелова В.В., Самойлов А.Е. Бухарина А.Ю., Шипулина О.Ю., Корнеенко Е.В., Акимкин В.Г.**
Генетическая вариабельность SARS-CoV-2 в биологических образцах от пациентов г. Москвы* 511
- Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Патяшина М.А., Сизова Е.П., Юзлибаева Л.Р., Лялина Л.В., Смирнов В.С., Бадамшина Г.Г., Гончарова А.В., Арбузова Т.В., Ломоносова В.И., Тотолян А.А.**
Характеристика серопревалентности к SARS-CoV-2 среди населения Республики Татарстан на фоне COVID-19 518
- Зайцев Е.М., Брицина М.В., Озерецковская М.Н., Мерцалова Н.У., Бажанова И.Г.**
Чувствительность биопленок вакцинных и свежeweыделенных штаммов *Bordetella pertussis* к антибиотикам 529
- Бисенбай А.О., Жигайлов А.В., Перфильева Ю.В., Найзабаева Д.А., Неупокоева А.С., Бердыгулова Ж.А., Остапчук Е.О., Мальцева Э.Р., Куатбекова С.А., Низкородова А.С., Дмитровский А.М., Скиба Ю.А., Мамадалиев С.М.**
Эпидемиология и молекулярно-генетическая характеристика возбудителей Лайм-боррелиоза, циркулирующих в популяции клещей на территории Алматинской области Республики Казахстан 535
- Воронина О.Л., Тартаковский И.С., Ющук Н.Д., Рыжова Н.Н., Аксёнова Е.И., Кунда М.С., Кутузова А.В., Мелкумян А.Р., Карпова Т.И., Груздева О.А., Климова Е.А., Кареткина Г.Н., Чемерис О.Ю., Тарасова Т.А., Дронина Ю.Е., Орлова О.Е., Бурмистрова Е.Н., Цибин А.Н.**
Анализ спорадических случаев инвазивного листериоза в мегаполисе* 546
- Устюжанин А.В., Чистякова Г.Н., Ремизова И.И.**
Филогенетический анализ родства штаммов *Klebsiella pneumoniae* по генам *ige* и *fim* 556
- Ленева И.А., Фалынскова И.Н., Карташова Н.П., Глубокова Е.А., Поддубиков А.А., Светич О.А.**
Изучение роли иммунитета к нейраминидазе вируса гриппа в защите от вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной *S. aureus* после гриппозной инфекции у мышей 564
- Плеханов Н.А., Заднова С.П., Крицкий А.А., Полунина Т.А., Котова Н.В., Баданин Д.В., Смирнова Н.И.**
Протеомный анализ типичных и генетически измененных штаммов *Vibrio cholerae* O1 серогруппы биовара El Tor 578
- Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Водопьянов С.О., Олейников И.П.**
Совершенствование методики SNP-типирования штаммов *Vibrio cholerae* на основе анализа первичных данных полногеномного секвенирования 587
- ОБЗОРЫ**
- Андрюков Б.Г., Ляпун И.Н., Матосова Е.В.**
Значение мембранных фосфолипидов в реализации защитных стратегий бактерий 594
- КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ**
- Гольдштейн Э.М.**
Факторы, влияющие на смертность от новой коронавирусной инфекции в разных субъектах Российской Федерации 604
- ХРОНИКА**
- Акимкин В.Г.**
Резолюция Всероссийской научно-практической интернет-конференции с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность–2020» (Москва, 6–8 октября 2020 г.) 608
- Акимкин В.Г.**
Резолюция Всероссийской научно-практической интернет-конференции с международным участием «Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы» (Москва, 19–20 октября 2020 г.) 610
- Акимкин В.Г.**
Резолюция 8-го Конгресса с международным участием «Контроль и профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП-2020)» (Москва, 25–27 ноября 2020 г.) 613
- НЕКРОЛОГИ**
- Памяти Валентина Ивановича Покровского 615
- Указатель статей, опубликованных в журнале в 2020 году 617

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

CONTENTS

ORIGINAL RESEARCHES

Speranskaya A.S., Kaptelova V.V., Samoilov A.E., Bukharina A.Yu., Shipulina O.Yu., Korneenko E.V., Akimkin V.G. Genetic variability of SARS-CoV-2 in biological samples from patients in Moscow*	511
Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Melnikova A.A., Patyashina M.A., Sizova E.P., Yuzlibaeva L.R., Lyalina L.V., Smirnov V.S., Badamshina G.G., Goncharova A.V., Arbuzova T.V., Lomonosova V.I., Totolian A.A. Distribution of SARS-CoV-2 seroprevalence among residents of the Republic of Tatarstan during the COVID-19 epidemic period	518
Zaytsev E.M., Britsina M.V., Ozeretskovskaya M.N., Mertsalova N.U., Bazhanova I.G. Sensitivity of biofilms of vaccine and freshly isolated <i>Bordetella pertussis</i> strains to antibiotics	529
Bissenbay A.O., Zhigailov A.V., Perfilyeva Yu.V., Naizabayeva D.A., Neupokoyeva A.S., Berdygulova Zh.A., Ostapchuk E.O., Maltseva E.R., Kumatbekova S.A., Nizkorodova A.S., Dmitrovskiy A.M., Skiba Y.A., Mamadaliyev S.M. Epidemiology and molecular genetic characteristics of Lyme borreliosis pathogens circulating in tick's population in the Almaty oblast of the Republic of Kazakhstan	535
Voronina O.L., Tartakovsky I.S., Yuysuk N.D., Ryzhova N.N., Kunda M.S., Aksenova E.I., Kutuzova A.V., Melkumyan A.R., Karpova T.I., Gruzdeva O.A., Klimova E.A., Karetkina G.N., Chemeris O.Yu., Tarasova T.A., Dronina Yu.E., Orlova O.E., Burmistrova E.N., Tsibin A.N. Analysis of sporadic cases of invasive listeriosis in a metropolis*	546
Ustyuzhanin A.V., Chistyakova G.N., Remizova I.I. The relatedness of <i>Klebsiella pneumoniae</i> strains based on phylogenetic analysis of <i>uge</i> and <i>fim</i> genes	556
Leneva I. A., Falynskova I. N., Kartashova N., Glubokova E., Poddubikov A.V., Svitich O.A. The study of neuraminidase immunity in protection against secondary bacterial pneumonia induced by <i>S. aureus</i> after influenza infection in mice	564
Plekhanov N.A., Zadnova S.P., Kritsky A.A., Polunina T.A., Kotova N.V., Badanin D.V., Smirnova N.I. Proteomic analysis of typical and genetically altered strains of <i>Vibrio cholerae</i> serogroup O1, biovar El Tor	578
Vodopianov A.S., Pisanov R.V., Vodopianov S.O., Oleynikov I.P. Improvement of the technique of SNP-typing of <i>Vibrio cholerae</i> strains on the basis of the analysis of the primary data of whole genome sequencing	587
REVIEWS	
Andryukov B.G., Lyapun I.N., Matosova E.V. The role of membrane phospholipids in the implementation of protective strategies of bacteria	578
SHORT COMMUNICATIONS	
Goldstein E.M. Factors affecting mortality for the novel coronavirus infection in different regions of the Russian Federation	588
CHRONICLE	
Akimkin V.G. Resolution of the All-Russian Scientific and Practical Internet Conference with International Participation "Molecular Diagnostics and Biosafety-2020" (Moscow, October 6-8, 2020)	604
Akimkin V.G. Resolution of the All-Russian Scientific and Practical Internet Conference with International Participation "Modern immunization: challenges, opportunities, prospects" (Moscow, October 19–20, 2020)	606
Akimkin V.G. Resolution of the 8th Congress with International Participation "Control and prevention of healthcare associated infections (ISMP-2020)" (Moscow, November 25–27, 2020)	609
OBITUARY	
In memory of Valentin Ivanovich Pokrovsky	611
Index of articles published in 2020	613

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

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

© Коллектив авторов, 2020



Генетическая вариабельность SARS-CoV-2 в биологических образцах от пациентов г. Москвы

Сперанская А.С.[✉], Каптелова В.В., Самойлов А.Е., Бухарина А.Ю., Шипулина О.Ю., Корнеенко Е.В., Акимкин В.Г.

ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, Москва, Россия

Сосуществование субпопуляций SARS-CoV-2 с различными вариантами генома внутри организма одного пациента — один из обсуждаемых в настоящее время феноменов. В данной работе мы провели высокопроизводительное секвенирование и сборку полных геномов вирусов из образцов, которые представляли собой мазки или аутопсийный материал от пациентов с диагнозом COVID-19, предварительно подтвержденным методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (Ct = 10,4–19,8). Подготовку образцов к секвенированию проводили с помощью протокола SCV-2000bp. Полученные данные проверяли на присутствие в образце более чем одного генетического варианта SARS-CoV-2. Варианты нуклеотидных замен, покрытие для каждого варианта, а также координаты вариабельной позиции в референсном геноме определяли с помощью инструментов программы «CLC Genomics Workbench». При поиске вариабельных нуклеотидных позиций исходили из предположения, что в образце имеются 2 генетических варианта (не более), для вероятности определяемого варианта использовали пороговое значение $\geq 90\%$. Также игнорировали варианты, которые были представлены менее чем 20% прочтений от общего покрытия. Полученные результаты показали, что в 5 образцах имеется вариабельность, т.е. содержится несколько генетических вариантов SARS-CoV-2. В 4 образцах оба найденных варианта геномов различались лишь в одной нуклеотидной позиции. В пятом образце были найдены более существенные различия: сразу 3 вариабельных позиции и одна делеция длиной в 3 нуклеотида. Наше исследование показывает возможность сосуществования различных генетических вариантов SARS-CoV-2 в организме пациента.

Ключевые слова: SARS-CoV-2; высокопроизводительное секвенирование; двойная инфекция; квазивиды.

Источник финансирования. Данная работа поддержана частично грантом РФФИ № 20-04-60561 (секвенирование), а также частично грантом в форме субсидии на создание и развитие «Центра геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий», соглашение № 075-15-2019-1666 (анализ данных).

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

Для цитирования: Сперанская А.С., Каптелова В.В., Самойлов А.Е., Бухарина А.Ю., Шипулина О.Ю., Корнеенко Е.В., Акимкин В.Г. Генетическая вариабельность SARS-CoV-2 в биологических образцах от пациентов г. Москвы. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(6): 511–517. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-6-1>

Поступила 30.11.2020
Принята в печать 01.12.2020

Genetic variability of SARS-CoV-2 in biological samples from patients in Moscow

Anna S. Speranskaya[✉], Valeria V. Kaptelova, Andrey E. Samoilov, Anna Yu. Bukharina, Olga Yu. Shipulina, Elena V. Korneenko, Vasily G. Akimkin

Central Research Institute of Epidemiology, 111123, Moscow, Russia

Currently, a lot of attention is given to SARS-CoV-2 subpopulations and their coexistence with different genomic variants within the same patient. In this study, we performed next-generation whole-genome sequencing and as-

sembly of viruses from samples representing swabs or autopsy specimens obtained from patients diagnosed with COVID-19, which were initially confirmed by the real-time polymerase chain reaction (Ct = 10.4–19.8). Samples were prepared for sequencing by using the SCV-2000bp protocol. The obtained data were checked for presence of more than one SARS-CoV-2 genetic variants in a sample. Variants of nucleotide substitutions, coverage for each variant, and location of the variable position in the reference genome were detected with tools incorporated in the CLC Genomics Workbench program. In our search for variable nucleotide positions, we assumed that the sample had two genetic variants (not more); the threshold value $\geq 90\%$ was set for probability of the identified variant. Variants represented by less than 20% of the reads in the total coverage were not taken into consideration. The obtained results showed that 5 samples had variability, i.e. they had several genetic variants of SARS-CoV-2. In 4 samples, both of the detected genomic variants differed only in one nucleotide position. The fifth sample demonstrated more substantial differences: a total of 3 variable positions and one three-nucleotide deletion. Our study shows that different genetic variants of SARS-CoV-2 can coexist within the same patient.

Keywords: SARS-CoV-2; next generation sequencing; dual infection; quasispecies.

Funding. This work was supported by (1) Russian Foundation for Basic Research (RFBR) grant № 20-04-60561 (sequencing) and (2) Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of a grant in the form of a subsidy for the creation and development of the «World-class Genomic Research Center for Ensuring Biological Safety and Technological Independence under the Federal Scientific and Technical Program for the Development of Genetic Technologies», agreement No. 075-15-2019-1666 (data analysis).

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

For citation: Speranskaya A.S., Kaptelova V.V., Samoilov A.E., Bukharina A.Yu., Shipulina O.Yu., Korneenko E.V., Akimkin V.G. Genetic variability of SARS-CoV-2 in biological samples from patients in Moscow. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(6): 511–517. (In Russ.), (In Engl.).
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-6-1>

Received 30 November 2020

Accepted 1 December 2020

Введение

Пандемия COVID-19, вызванная коронавирусом SARS-CoV-2, началась в конце декабря 2019 г. в Ухане (КНР). В России пик первой волны пришелся на середину мая 2020 г., вторая волна начала подниматься в конце августа. К 11.11.2020 г. число ежедневно регистрируемых в России новых случаев COVID-19 достигло примерно 19,9 тыс. (более 1,8 млн подтвержденных случаев в стране)¹. Уже в феврале 2020 г. опубликованы зарубежные данные высокопроизводительного секвенирования (next generation sequencing, NGS) геномов SARS-CoV-2, из которых следовало, что на филогенетическом древе последовательности делятся на две основные ветви (линии/типы/генотипы), которые были названы L и S. Они различаются однонуклеотидными полиморфизмами в ORF1ab и ORF8 [1]. К 10.11.2020 г. в базе данных GISAID² зарегистрированы геномы, относящиеся к 8 основным клатам: L, O, S, V, G, GR, GH, GV. Из них 6 клат были найдены среди российских изолятов уже в конце апреля 2020 г. [2], представители 7 клат (кроме GV) были зарегистрированы в GISAID в ноябре 2020 г. [3].

SARS-CoV-2 относится к РНК-вирусам, для которых характерна высокая частота мутаций.

Следствием этого служит формирование квазивидов (субпопуляций) в организме одного хозяина. В настоящее время уже зафиксирован факт существования квазивидов для SARS-CoV-2 [4–8], в том числе есть исследования, проведенные на большой выборке данных. В работе [9] осуществлен биоинформатический анализ результатов «сырых» данных NGS почти 4 тыс. образцов, полученных ранее различными лабораториями и выложенных в открытую базу данных SRA³. Кроме того, те же авторы выполнили биоинформатический анализ данных NGS РНК, выделенной из мазков от пациентов из Швейцарии, и обнаружили сосуществование различных вариантов генома SARS-CoV-2 внутри организма пациента. U. Fahnøe и соавт. объясняют это естественным генетическим разнообразием из-за быстрой вирусной эволюции (допуская, что часть вариантов генома могут быть артефактами, образовавшимися в процессе подготовки библиотек и секвенирования). Действительно, NGS — признанный инструмент для оценки генетической вариативности вирусных популяций [10, 11], для подтверждения существования квазивидов вируса в организме пациента [12]. Однако отличить истинные однонуклеотидные варианты (SNV) от ошибок секвенирования, артефактов пробоподготовки — сложная задача, особенно если речь идет об обнаружении редко встречающихся субпопуляций.

¹ [statista.com \[Electronic resource\]. URL: www.statista.com/statistics/1102303/coronavirus-new-cases-development-russia](https://www.statista.com/statistics/1102303/coronavirus-new-cases-development-russia)

² [gisaid.org \[Electronic resource\]. URL: www.gisaid.org](https://www.gisaid.org)

³ [URL: www.ncbi.nlm.nih.gov/sra](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra)

Явление, при котором в организме пациента присутствуют одновременно два или более вариантов одного вируса, также называют двойной инфекцией или ко-инфекцией, если она происходит одновременно с первым заражением или спустя некоторое время [13]. Это явление довольно хорошо исследовано среди вирусов различных семейств и родов [13–17]. Возможность ко-инфекции для SARS-CoV-2 пока что остается под вопросом, хотя доводы в пользу этого предположения постепенно накапливаются. Некоторые авторы интерпретируют как двойную инфекцию наблюдаемую гетерогенность в результатах секвенирования геномов SARS-CoV-2. Например, такие выводы были сделаны в работе [18], описывающей результаты секвенирования фрагмента (длиной 795 п.н.) гена, кодирующего Spike-белок вируса, из образцов от 19 пациентов в Ираке с явными симптомами COVID-19. Секвенирование проводилось методом Сэнгера, двойные пики на хроматограммах были обнаружены во всех 19 образцах.

Наличие гетерогенности в результатах секвенирования авторы объясняют ко-инфекцией, а столь высокий процент (19/19) — особенностями национального подхода к соблюдению санитарных норм (возможность контаминации не рассматривалась). Помимо вышеупомянутого препринта, в конце сентября 2020 г. о случае двойной инфекции SARS-CoV-2 у одного пациента сообщили авторы работы [19] со ссылкой на данные S. Ilmjärv и соавт. [20]. В нашей работе, опубликованной в виде препринта, также приводятся доказательства в пользу возможности двойной инфекции SARS-CoV-2: описан случай обнаружения геномов, относящихся к кладам GR и GH, у пациентки 90 лет, а также смены доминирующего штамма в процессе заболевания [21].

Мутации, возникающие в популяции вследствие естественной эволюции вируса, как и инфицирование другим штаммом, могут влиять на иммунный ответ организма хозяина, изменять клиническое течение заболевания. Высказывались предположения, что отдельные мутации SARS-CoV-2 или их комбинации могут влиять на скорость репликации вируса и передачи заболевания, приводить к проблемам при лечении из-за формирующихся мутаций устойчивости к противовирусным препаратам [22, 23].

Цель этой работы — показать наличие квазивидов вируса, по крайней мере, в некоторых биологических образцах от пациентов из Москвы с подтвержденной инфекцией SARS-CoV-2.

Материалы и методы

Для проведения исследования были использованы мазки (19 образцов) и аутопсийный материал (2 образца) в транспортной среде от пациентов с симптомами ОРВИ или подозрениями на COVID-19, которые предварительно поступили в

подразделение молекулярных методов диагностики ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии и там же были идентифицированы как положительные на наличие SARS-CoV-2. Для идентификации использовали метод полимеразной цепной реакции в реальном времени, который проводили с помощью набора реагентов «AmpliSens® Cov-Bat-FL» («AmpliSens», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Все использованные в работе образцы содержали вирусную РНК в высокой концентрации ($C_t = 10,4–19,8$).

Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием 10 мкл образцов РНК и набора «Reverta-L kit» («AmpliSens», Россия) согласно инструкции производителя. Полученную кДНК применяли в качестве матрицы для амплификации фрагментов генома. Фрагменты генома SARS-CoV-2 амплифицировали с помощью разработанной нами праймерной панели SCV-200bp [23].

Образцы готовили к секвенированию согласно протоколу [24]. Для амплификации фрагментов генома использовали Q5 High-Fidelity ДНК-полимеразу («New England BioLabs»), 35 циклов амплификации. Для подготовки библиотек использовали ту же полимеразу, 8 циклов амплификации. NGS выполнено на платформе «Illumina HiSeq 1500» с использованием наборов реагентов «HiSeq PE Rapid Cluster Kit v2» и «HiSeq Rapid SBS Kit v2» (500 циклов) или на платформе «Illumina MiSeq» с набором «MiSeq Reagent Kit v2» (500 циклов).

Полученные прочтения были отфильтрованы по качеству с помощью «Trimmomatic» [25]; последовательности праймеров удалены с помощью cutadapt [26]; полученные прочтения картированы на референсную последовательность EPI_ISL_402124 с использованием bowtie2 [27]; с помощью SAMtools [28] удалены химерные прочтения и получены bam-файлы. Консенсусные последовательности получали с помощью BEDtools [29]. Для идентификации и расчета покрытия SNV был использован встроенный инструмент программы «CLC Genomics Workbench 8.5»⁴. В процессе анализа мы исходили из предположения, что в образце может находиться одновременно не более 2 вариантов геномов (использовали алгоритм fixed ploidy variant = 2). В качестве порогового значения детекции SNV использовали покрытие $\geq 20\%$ (варианты замен с низким покрытием не учитывали).

Результаты

Консенсусные последовательности геномов исследованных образцов с указанием SNV в формате вырожденного нуклеотидного кода были депонированы в базу данных GISAID (номера доступа

⁴ CLC Genomics Workbench. [Electronic resource]. URL: www.qiagenbioinformatics.com/products/clc-genomics-workbench

Таблица 1. Описание гетерогенных позиций в проанализированных образцах**Table 1.** Description of degenerate positions in analyzed samples

Образец Sample	Ct	Количество прочтений после фильтрации Reads after filtration	Позиция нуклеотида Nucleotide position	Покрывание Total coverage	Варианты нуклеотида Nucleotide variants	Вариант покрытия Variant coverage	Доля прочтений Percent of reads	Мутация белка Protein mutation	Номер доступа в GISAID GISAID accession number
d186s128	16	7 575 603	23613	450	C	207	46%	Spike A684V	EPI_ISL_660437
					T	243	54%		
d186l325	13,6	6 337 032		Нет вырожденных позиций / No degenerate positions					EPI_ISL_610232
d186s56	10,4	6 481 901		Нет вырожденных позиций / No degenerate positions					EPI_ISL_610240
d186s51	13,7	12790208		Нет вырожденных позиций / No degenerate positions					EPI_ISL_610239
d186s137	16,3	7 992 766	23916	15388	T	9314	60,53%	Spike V785A	EPI_ISL_660438
					C	6065	39,41%		
d186s144	11,2	6 928 932		Нет вырожденных позиций / No degenerate positions					EPI_ISL_610241
d186s149	13,5	7 026 576		Нет вырожденных позиций / No degenerate positions					EPI_ISL_610242
d186s155	12,6	6 815 104		Нет вырожденных позиций / No degenerate positions					EPI_ISL_610243
d186s434	14	7 722 664		Нет вырожденных позиций / No degenerate positions					EPI_ISL_610244
d186dl199	15,1	3 163 502		Нет вырожденных позиций / No degenerate positions					EPI_ISL_610227
d186dl222	18,1	2 885 286		Нет вырожденных позиций / No degenerate positions					EPI_ISL_610228
d186dl240	19,8	1 467 205	8139	24	C	8	33,33%	NSP3S1807F	EPI_ISL_660433
					T	16	66,67%		
d186dl282	13,4	4 043 559		Нет вырожденных позиций / No degenerate positions					EPI_ISL_610229
d186dl290	13	557 624	24794	4424	G	1596	36,08%	Spike A1078S	EPI_ISL_660434
					T	2825	63,86%		
d186dl294	12,9	6 481 228		Нет вырожденных позиций / No degenerate positions					EPI_ISL_610230
d186dl302	12,4	3 742 501		Нет вырожденных позиций / No degenerate positions					EPI_ISL_610231
d186dl365	14,3	5625499		Нет вырожденных позиций / No degenerate positions					EPI_ISL_610233
d186dl381	13,4	3 066 646		Нет вырожденных позиций / No degenerate positions					EPI_ISL_610234
d186dl389	13	3 424 997		Нет вырожденных позиций / No degenerate positions					EPI_ISL_610235
d186dl441	14,3	4 940 467		Нет вырожденных позиций / No degenerate positions					EPI_ISL_610236
d186dl477	12	2 500 575	21588	17058	T	8950	52,47%	Spike P9L	Варианты нуклеотидов с мажорным покрытием — EPI_ISL_660435, с минорным покрытием — EPI_ISL_660436 Nucleotide variants with major coverage — EPI_ISL_660435, with minor coverage — EPI_ISL_660436
					C	8107	47,53%		
		21991–21993	14810		TTA	11250	75,96%	Spike Y145del	
					---(del)	3544	23,93%		
		27247	7923		C	4870	61,47%	ORF6 синонимичная замена ORF6 synonymous	
					T	3043	38,41%		
		29250	1245		T	873	70,12%	N P326L	
					C	370	29,72%		

приведены в **табл. 1**), за исключением одного образца — d186dl477 (детали см. ниже).

После фильтрации по качеству, тримминга праймеров полимеразной цепной реакции количество информации на каждый образец составило от 0,557 млн до 11,965 млн прочтений (медиана — 6 млн). Затем был проведен анализ SNV в вирусной популяции для каждого образца. Картирование прочтений на референсный геном hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019 (номер доступа в базе GISAID EPI_ISL_402124) показало, что в некоторых образцах имеются вариабельные/вырожденные SNV-позиции. Доля минорных субпопуляций (оценивалась по покрытию минорного варианта SNV) варьировала от 24% до 46%. Наличие вариабельности не зависело ни от количества прочтений, ни от вирусной нагрузки в образце (см., например, образцы d186s56, Ct = 10,4 или d186s144, Ct = 11,2, в которых вариабельные позиции не найдены).

SNV в гене, кодирующем белок S (Spike Glycoprotein), были обнаружены в 4 образцах: d186s128, d186s137, d186dl290 и d186dl477. При этом в одном из образцов в том же гене *spike glycoprotein* был найден гетерогенный участок, представленный в одном из двух вариантов геномов делецией ТТА/---. Кроме того, SNV были найдены на участке *ORF1ab*, кодирующем белок nsp3 (см. образец d186dl240), а также в генах *N* и *ORF6* (кодируют одноименные белки, см. образец d186dl477).

Образец d186dl477 заслуживает особого внимания, поскольку в нем были найдены сразу 3 SNV, а также делеция в три нуклеотида. Один из SNV приводит к синонимичной замене в ORF6, другие — к мутациям в белке Spike (P9L и Y145del), а также в белке N (P326L). Все найденные мутации относятся к категории редко встречающихся или новых (**табл. 2**). Покрытие минорных вариантов мутаций варьировало в этом образце от 29,7% до 47%. Мы депонировали в базу данных GISAID две последовательности: последовательность [EPI_ISL_660435] включает в себя мажорные варианты мутаций, тогда как [EPI_ISL_660436] — минорные варианты.

Обсуждение

В настоящей работе мы намеренно ограничились поиском только лишь высокопредставленных вариантов, поскольку основной целью было показать широкую распространенность гетерогенных популяций SARS-CoV-2. Мы проанализировали данные NGS геномов SARS-CoV-2 и оценили представленность вирусных субпопуляций, используя алгоритмы поиска вариабельности, реализованные в виде встроенных инструментов программы «CLC Genomics Workbench». Мы не определяли оптимальные критерии для идентификации SNV, ограничившись применением жестких критериев (не менее 20% от общего покрытия анализируемой позиции при достоверности определения 90% и более). Мы

Таблица 2. Характеристика мутаций, найденных в образце d186dl477

Table 2. Characterization of mutations found in sample d186dl477

Белок Protein	EPI_ISL_660435	EPI_ISL_660436	Частота встречаемости мутаций среди известных последовательностей геномов SARS-CoV-2 по данным GISAID, депонированных в базу данных на 27.11.2020 г. Frequency of found mutations among known SARS-CoV-2 sequences according to GISAID data, as of November 27, 2020		
			%	число геномов number of genomes	число стран number of countries
NSP2	T547I		0,07	55	10
NSP3	V1847F		>0,01	7	2
NSP12	P323L		88,88	184 070	125
Spike	P9L	–	0,01	27	7
	–	Y145del		Неизвестная новая мутация Found for the first time	
		D614G	89,28	18 5187	26
N	R203K		36,46	75 504	104
	G204R		36,15	74 866	103
	M210I		0,24	488	18
	A211V		0,08	175	22
	P326L	–	0,02	41	8

Примечание. Выделены мутации, для которых частота встречаемости в мире $\leq 0,25$.
Note. Mutations for which the frequency of occurrence in the world is ≤ 0.25 are in bold.

идентифицировали SNV в 5 образцах из 21. В 4 образцах квазивиды различались единичными SNV.

Для РНК-вирусов характерна высокая скорость мутаций, что часто приводит к формированию квазивидов в организме одного хозяина. Во многих работах в образцах от больных COVID-19 идентифицированы одновременно несколько вирусов с разными SNV в геномах [6–9, 19]. Мы полагаем, что найденные в 4 образцах единичные SNV также можно объяснить естественной эволюцией вирусных геномов в организме хозяина.

Пятый образец (d186dl477) отличался от прочих гетерогенных образцов тем, что в нем были обнаружены сразу 3 SNP и 1 гетерогенный участок длиной в 3 нуклеотида. При этом значения относительного покрытия в этих позициях, хотя и различались, но не принципиально, что позволяет утверждать, что в этом образце имеется смесь штаммов. Мы полагаем, что для объяснения этого явления можно выдвинуть два предположения: беспрецедентно быстрая эволюция вируса в организме именно этого пациента либо инфекция разными штаммами SARS-CoV-2.

Недавно опубликованные работы показывают, что частота мутаций SARS-CoV-2 — примерно такая же, как и в геноме SARS-CoV ($0,80\text{--}2,38 \times 10^{-3}$ нуклеотидных замен на сайт в год) [19, 30, 31]. J. Kuipers и соавт. [9], статистически проанализировав большое количество «сырых» данных секвенирования из разных лабораторий, показали, что гетерогенность вирусной популяции в образце положительно коррелирует с увеличением возраста пациентов. Образец d186dl477 был получен от 84-летней пациентки. Если мы примем для теоретических расчетов скорость мутаций, равную максимально возможной ($2,38 \times 10^{-3}$ нуклеотидных замен на сайт в год), то при продолжительности развития заболевания 5 дней в геноме SARS-CoV-2 могло сформироваться до 10 мутаций.

В пользу предположения об эволюции также свидетельствует тот факт, что четыре из общих для обоих штаммов мутаций имеют низкую частоту встречаемости в мире — $>0,01\text{--}0,24\%$. Образование SNV в результате последовательной эволюции должно было бы отразиться на частоте мутаций. Однако наблюдаемая разница в значениях покрытий минорного SNV невелика. В отсутствие клинических данных и информации о продолжительности заболевания у пациента, от которого был получен образец d186dl477, мы не можем однозначно утверждать, что гетерогенность является следствием естественной эволюции вируса. Данных для обоснования альтернативной гипотезы (о ко-инфекции, возникшей вследствие заражения вторым штаммом SARS-CoV-2) также недостаточно.

Вслед за авторами работы [9] мы полагаем, что важно установить (в перспективе), связана ли

гетерогенность популяций SARS-CoV-2 с прогрессированием заболевания, увеличивается ли вероятность обнаружения гетерогенных образцов вместе с возрастом пациента. Также необходимо определить критерии, позволяющие отличить случаи повторного заражения от гетерогенности, возникающей вследствие естественной эволюции вируса.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Tang X., Wu C., Li X., Song Y., Yao X., Wu X., et al. On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2. *Natl. Sci. Rev.* 2020; 7(6): 1012–23. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa036>
2. Komissarov A.B., Safina K.R., Garushyants S.K., Fadeev A.V., Sergeeva M.V., Ivanova A.A., et al. Genomic epidemiology of the early stages of SARS-CoV-2 outbreak in Russia. *medRxiv*. Preprint. 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.07.14.20150979>
3. Sýkorová E., Fajkus J., Mezníková M., Lim K.Y., Nephlechová K., Blattner F.R., et al. Minisatellite telomeres occur in the family Alliaceae but are lost in Allium. *Am. J. Bot.* 2006; 93(6): 814–23. <https://doi.org/10.3732/ajb.93.6.814>
4. Nyayanit D., Yadav P.D., Kharde R., Shete-Aich A. Quasispecies analysis of the SARS-CoV-2 from representative clinical samples: A preliminary analysis. *Indian J. Med. Res.* 2020; 152(1): 105. https://doi.org/10.4103/ijmr.ijmr_2251_20
5. Jary A., Leducq V., Malet I., Marot S., Klement-Frutos E., Teyssou E., et al. Evolution of viral quasispecies during SARS-CoV-2 infection. *Clin. Microbiol. Infect.* 2020; 26(11): 1560.e1–1560.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.07.032>
6. Chaudhry M.Z., Eschke K., Grashoff M., Abassi L., Kim Y., Brunotte L., et al. SARS-CoV-2 quasispecies mediate rapid virus evolution and adaptation. *bioRxiv*. Preprint. 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.08.10.241414>
7. Xu D., Zhang Z., Wang F.S. SARS-associated coronavirus quasispecies in individual patients. *N. Engl. J. Med.* 2004; 350(13): 1366–7. <https://doi.org/10.1056/nejmc032421>
8. Park D., Huh H.J., Kim Y.J., Son D.S., Jeon H.J., Im E.H., et al. Analysis of intrapatient heterogeneity uncovers the microevolution of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Mol. Case Stud.* 2016; 2(6): a001214. <https://doi.org/10.1101/mcs.a001214>
9. Kuipers J., Batavia A.A., Jablonski K.P., Bayer F., Borgsmüller N., Dondi A., et al. Within-patient genetic diversity of SARS-CoV-2. *bioRxiv*. Preprint. 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.10.12.335919>
10. McElroy K., Zagordi O., Bull R., Luciani F., Beerenwinkel N. Accurate single nucleotide variant detection in viral populations by combining probabilistic clustering with a statistical test of strand bias. *BMC Genomics.* 2013; 14(1): 501. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-501>
11. Fahnøe U., Pedersen A.G., Dräger C., Orton R.J., Blome S., Höper D., et al. Creation of functional viruses from non-functional cDNA clones obtained from an RNA virus population by the use of ancestral reconstruction. *PLoS One.* 2015; 10(10): e0140912. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140912>
12. Kireev D.E., Lopatukhin A.E., Murzakova A.V., Pimkina E.V., Speranskaya A.S., Neverov A.D., et al. Evaluating the accuracy and sensitivity of detecting minority HIV-1 populations by Illumina next-generation sequencing. *J. Virol. Methods.* 2018; 261: 40–5. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.08.001>
13. Лаповок И.А., Лопатухин А.Э., Киреев Д.Е. Двойная ВИЧ-инфекция: эпидемиология, клиническая значимость и диагностика. *Инфекционные болезни.* 2019; 17(2): 81–7. [Lapovok I.A., Lopatukhin A.E., Kireev D.E. Dual HIV infection: epidemiology, clinical significance, and diagnosis. *Infektsionnye bolezni.* 2019; 17(2): 81–7. (in Russ.)] <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2019-2-81-87>

14. Falchi A., Arena C., Andreoletti L., Jacques J., Leveque N., Blanchon T., et al. Dual infections by influenza A/H3N2 and B viruses and by influenza A/H3N2 and A/H1N1 viruses during winter 2007, Corsica Island, France. *J. Clin. Virol.* 2008; 41(2): 148–51. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2007.11.003>
15. Semple M.G., Cowell A., Dove W., Greensill J., McNamara P.S., Halfhide C., et al. Dual infection of infants by human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus is strongly associated with severe bronchiolitis. *J. Infect. Dis.* 2005; 191(3): 382–6. <https://doi.org/10.1086/426457>
16. van der Kuyl A.C., Cornelissen M. Identifying HIV-1 dual infections. *Retrovirology.* 2007; 4: 67. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-4-67>
17. Weinberg A., Bloch K.C., Li S., Tang Y.W., Palmer M., Tyler K.L. Dual infections of the central nervous system with Epstein-Barr virus. *J. Infect. Dis.* 2005; 191(2): 234–7. <https://doi.org/10.1086/426402>
18. Hashim H.O., Mohammed M.K., Mousa M.J., Abdula-meer H.H., Alhassnawi A.T., Hassan S.A., et al. Unexpected co-infection with different strains of SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Preprints.org.* 2020. Preprint. <https://doi.org/10.20944/preprints202009.0375.v1>
19. Liu S., Shen J., Fang S., Li K., Liu J., Yang L., et al. Genetic spectrum and distinct evolution patterns of SARS-CoV-2. *Front. Microbiol.* 2020; 11: 593548. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.593548>
20. Gudbjartsson D.F., Helgason A., Jonsson H., Magnusson O.T., Melsted P., Norddahl G.L., et al. Spread of SARS-CoV-2 in the Icelandic population. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(24): 2302–15. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2006100>
21. Samoilov A., Kaptelova V.V., Bukharina A.Y., Shipulina O.Y., Korneenko E.V., Lukyanov A.V. et al. Change of dominant strain during dual SARS-CoV-2 infection: preprint. *medRxiv.* Preprint. 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.11.29.20238402>
22. Ilmjärvi S., Abdul F., Acosta-Gutiérrez S., Estarellas C., Gal-dadas I., Casimir M., et al. Epidemiologically most successful SARS-CoV-2 variant: concurrent mutations in RNA-dependent RNA polymerase and spike protein. *medRxiv.* Preprint. 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.08.23.20180281>
23. Speranskaya A., Kaptelova V., Valdokhina A., Bulanenko V., Samoilov A., Korneenko E., et al. SCV-2000bp: a primer panel for SARS-CoV-2 full-genome sequencing. *bioRxiv.* Preprint. 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.08.04.234880>
24. Kaptelova V.V., Speranskaya A.S. Protocol for SCV-2000bp: a primer panel for SARS-CoV-2 full-genome sequencing v1. <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bn77mhrn>
25. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014; 30(15): 2114–20. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
26. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal.* 2011; 17(1): 10. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
27. Langmead B., Salzberg S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods.* 2012; 9(4): 357–9. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
28. Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009; 25(16): 2078–9. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
29. Quinlan A.R., Hall I.M. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics.* 2010; 26(6): 841–2. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>
30. Romano M., Ruggiero A., Squeglia F., Maga G., Berisio R. A structural view of SARS-CoV-2 RNA replication machinery: RNA synthesis, proofreading and final capping. *Cells.* 2020; 9(5): 1267. <https://doi.org/10.3390/cells9051267>
31. Zhao Z., Li H., Wu X., Zhong Y., Zhang K., Zhang Y.P., et al. Moderate mutation rate in the SARS coronavirus genome and its implications. *BMC Evol. Biol.* 2004; 4: 21. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-4-21>

Сведения об авторах

Сперанская Анна Сергеевна[✉] — к.б.н., рук. научной группы геномики и постгеномных технологий ЦНИИ Эпидемиологии, 111123, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6326-1249>.
E-mail: hanna.s.939@gmail.com

Каптелова Валерия Владимировна — м.н.с. группы геномики и постгеномных технологий ЦНИИ Эпидемиологии, 111123, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0952-0830>.

Самойлов Андрей Евгеньевич — н.с. группы геномики и постгеномных технологий ЦНИИ Эпидемиологии, 111123, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8284-3164>.

Бухарина Анна Юрьевна — лаборант-исследователь подразделения молекулярных методов диагностики ЦНИИ Эпидемиологии.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6892-3595>.

Шипулина Ольга Юрьевна — к.м.н., рук. подразделения лабораторной медицины и продвижения лабораторных услуг отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ЦНИИ Эпидемиологии, 111123, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4679-6772>.

Корнеенко Елена Васильевна — м.н.с. группы геномики и постгеномных технологий ЦНИИ Эпидемиологии, 111123, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4679-6772>.

Акимкин Василий Геннадьевич — д.м.н., проф., акад. РАН, директор ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, 111123, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>.

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Information about the authors

Anna S. Speranskaya[✉] — PhD, Head, Group for genomics and post-genome technology, Central Research Institute of Epidemiology, 111123, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6326-1249>.
E-mail: hanna.s.939@gmail.com

Valeria V. Kaptelova — junior researcher, Group for genomics and post-genome technology, Central Research Institute of Epidemiology, 111123, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0952-0830>

Andrei E. Samoilov — researcher, Group for genomics and post-genome technology, Central Research Institute of Epidemiology, 111123, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8284-3164>

Anna Yu. Bukharina — laboratory researcher assistant (Molecular diagnostic methods department), Central Research Institute of Epidemiology, 111123, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6892-3595>

Olga Yu. Shipulina — PhD, Head, Molecular diagnostic methods department, Central Research Institute of Epidemiology, 111123, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4679-6772>

Elena V. Korneenko — junior researcher, Group for genomics and post-genome technology, Central Research Institute of Epidemiology, 111123, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4679-6772>

Vasily G. Akimkin — D. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, Director, Central Research Institute of Epidemiology, 111123, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>



Характеристика серопревалентности к SARS-CoV-2 среди населения Республики Татарстан на фоне COVID-19

Попова А.Ю.¹, Ежлова Е.Б.¹, Мельникова А.А.¹, Пяташина М.А.², Сизова Е.П.³, Юзлибаева Л.Р.², Лялина Л.В.⁴, Смирнов В.С.⁴, Бадамшина Г.Г.³, Гончарова А.В.³, Арбузова Т.В.⁴, Ломоносова В.И.⁴, Тотолян А.А.⁴

¹Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 127994, Москва, Россия;

²Управление Роспотребнадзора по Республике Татарстан, 420111, Казань, Россия;

³ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан», 420061, Казань, Россия;

⁴ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 197101, Санкт-Петербург, Россия

В конце 2019 г. появились сообщения о вспышке инфекции, вызванной новым штаммом β -коронавируса SARS-CoV-2, заболевание ВОЗ определила как coronavirus disease 2019 (COVID-19). В Республике Татарстане первый случай COVID-19 был диагностирован 16.03.2020 г., это был завозной случай из Франции. Период нарастания заболеваемости продолжался с 12-й по 19-ю неделю, когда был зарегистрирован самый высокий показатель, составивший 16,7 на 100 тыс. населения. В дальнейшем отмечалось статистически значимое снижение заболеваемости. Исследование серопревалентности было проведено на 27-й неделе (8-я неделя снижения заболеваемости)

Целью проведенного сероэпидемиологического исследования было определение уровня и структуры популяционного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 среди населения Республики Татарстан в период распространения COVID-19.

Материалы и методы. Отбор волонтеров для исследования проводили методом анкетирования и рандомизации путем случайной выборки. Критерием исключения была активная инфекция COVID-19 в момент анкетирования. На наличие специфических антител к SARS-CoV-2 обследовано 2946 человек. Возраст обследованных добровольцев варьировал от 1 года до 70 лет и старше.

Результаты. Результаты исследования показали, что в Республике Татарстан в период заболеваемости COVID-19 наблюдалась умеренная серопревалентность к SARS-CoV-2, составившая 31,3%, на фоне высокой частоты (94,5%) бессимптомной инфекции у серопозитивных лиц, не имевших в анамнезе перенесенного заболевания COVID-19, положительного результата ПЦР и симптомов ОРВИ в день обследования. Максимальные показатели коллективного иммунитета установлены у детей 7–13 лет (42,0%), детей 14–17 лет (40,3%) при одновременном снижении серопревалентности у лиц в возрасте 70 лет и старше (24,0%). В разных регионах Республики Татарстан наблюдалось широкое варьирование показателей серопозитивности от минимального в Заинском районе (8,6%) до максимального в Арском районе (74,3%). В 21 районе из 38 обследованных результаты были нерепрезентативны из-за малого числа наблюдений. У реконвалесцентов COVID-19 антитела вырабатываются в 83,3% случаев. У лиц с позитивным результатом ПЦР-анализа, проведенного ранее, антитела выявлялись в 100% случаев. Среди волонтеров, имевших контакты с больными COVID-19, доля серопревалентных 37%.

Вывод. Динамику серопревалентности среди населения Республики Татарстан можно квалифицировать как позитивную. Полученные результаты могут быть использованы для разработки прогноза развития эпидемиологической ситуации, а также планирования мероприятий по специфической и неспецифической профилактике COVID-19.

Ключевые слова: коронавирусы; COVID-19; серопревалентность; Республика Татарстан; население.

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

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

Для цитирования: Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Пяташина М.А., Сизова Е.П., Юзлибаева Л.Р., Лялина Л.В., Смирнов В.С., Бадамшина Г.Г., Гончарова А.В., Арбузова Т.В., Ломоносова В.И., Тотолян А.А. Характеристика серопревалентности к SARS-CoV-2 среди населения Республики Татарстан на фоне COVID-19. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(6): 518–528.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-6-2>

Distribution of SARS-CoV-2 seroprevalence among residents of the Republic of Tatarstan during the COVID-19 epidemic period

Anna Yu. Popova¹, Elena B. Ezhlova¹, Albina A. Melnikova¹, Marina A. Patyashina²,
Elena P. Sizova³, Lilia R. Yuzlibaeva², Lyudmila V. Lyalina⁴, Vyacheslav S. Smirnov⁴✉,
Gulnara G. Badamshina³, Anna V. Goncharova³, Tatiana V. Arbusova⁴,
Valeria I. Lomonosova⁴, Areg A. Totolian⁴

¹Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 127994, Moscow, Russia;

²Department of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing for Tatarstan Republic, 420011, Kazan, Russia;

³Center for Hygiene and Epidemiology in Tatarstan Republic, 420061, Kazan, Russia;

⁴Saint Petersburg Pasteur Institute, 197101, Saint Petersburg, Russia

In late 2019, there were reports of an outbreak of infection caused by a new strain of beta coronavirus SARS-CoV-2, the WHO identified the disease as coronavirus disease 2019 (COVID-19). In Tatarstan, the first case of COVID-19 was diagnosed on March 16, 2020, it was an imported case from France. The period of increase in the incidence lasted during the 12th to the 19th week, when the highest rate was recorded, amounting to 16.7 per 100 thousand population. Subsequently, a statistically significant decrease in the incidence was noted. Seroprevalence study was conducted at week 27 (8th week of decline of morbidity).

The purpose of the seroepidemiological study was to measure the level and to identify the structure of herd immunity against the SARS-CoV-2 virus among the population of the Republic of Tatarstan during the rapid spread of the COVID-19 outbreak.

Materials and methods. The selection of volunteers for the study was carried out by the method of questionnaires and randomization by random sampling. The exclusion criterion was active COVID-19 infection at the time of the survey. 2,946 people were examined for the presence of specific antibodies to SARS-CoV-2. The age of the surveyed volunteers ranged from 1 year to 70 years and older.

Results. The results of the study showed that in the Republic of Tatarstan during the period of COVID-19 incidence, there was a moderate seroprevalence to SARS-CoV-2, which amounted to 31.3%, against the background of a high frequency (94.5%) of asymptomatic infection in seropositive individuals who did not have a history of past COVID-19 disease, positive PCR result and ARVI symptoms on the day of the examination. The maximum indicators of herd immunity were established in children aged 7–13 years (42.0%), children 14–17 years old (40.3%), with a simultaneous decrease in seroprevalence in persons aged 70 and older (24.0%). In different regions of the Republic of Tatarstan, there was a wide variation in seropositivity results from the minimum in the Zainsky district (8.6%) to the maximum in the Arsky district (74.3%). In 21 out of 38 surveyed districts, the results were unrepresentative due to the small sample size. In COVID-19 convalescents, antibodies are produced in 83.3% of cases. In persons with a positive result of the PCR analysis carried out earlier, antibodies were detected in 100% of cases. Among the volunteers who had contact with patients with COVID-19, the proportion of seropositive is 37%

Conclusion. The dynamics of seroprevalence among the population of the Republic of Tatarstan can be qualified as positive, the results obtained can be used to develop a forecast for the development of the epidemiological situation, as well as to plan measures for specific and non-specific prevention of COVID-19.

Keywords: *coronaviruses; COVID-19; seroprevalence; Republic of Tatarstan; population.*

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

For citation: Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Melnikova A.A., Patyashina M.A., Sizova E.P., Yuzlibaeva L.R., Lyalina L.V., Smirnov V.S., Badamshina G.G., Goncharova A.V., Arbusova T.V., Lomonosova V.I., Totolian A.A. Distribution of SARS-CoV-2 seroprevalence among residents of the Republic of Tatarstan during the COVID-19 epidemic period. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(6): 518–528. (In Russ.).
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-6-2>

Received 9 October 2020

Accepted 21 October 2020

Введение

Новое заболевание, напоминающее хорошо известную атипичную пневмонию, впервые было выявлено в китайском городе Ухане в декабре 2019 г., и уже к середине января 2020 г. было зафиксировано его стремительное распространение не только по

территории Китайской Народной Республики, но и в целом ряде других государств. К середине января 2020 г. стало понятно, что в мир пришла новая серьезная угроза не только общественному здравоохранению, но и общественно-политической ситуации в целом [1]. Ошеломляюще быстрое распространение

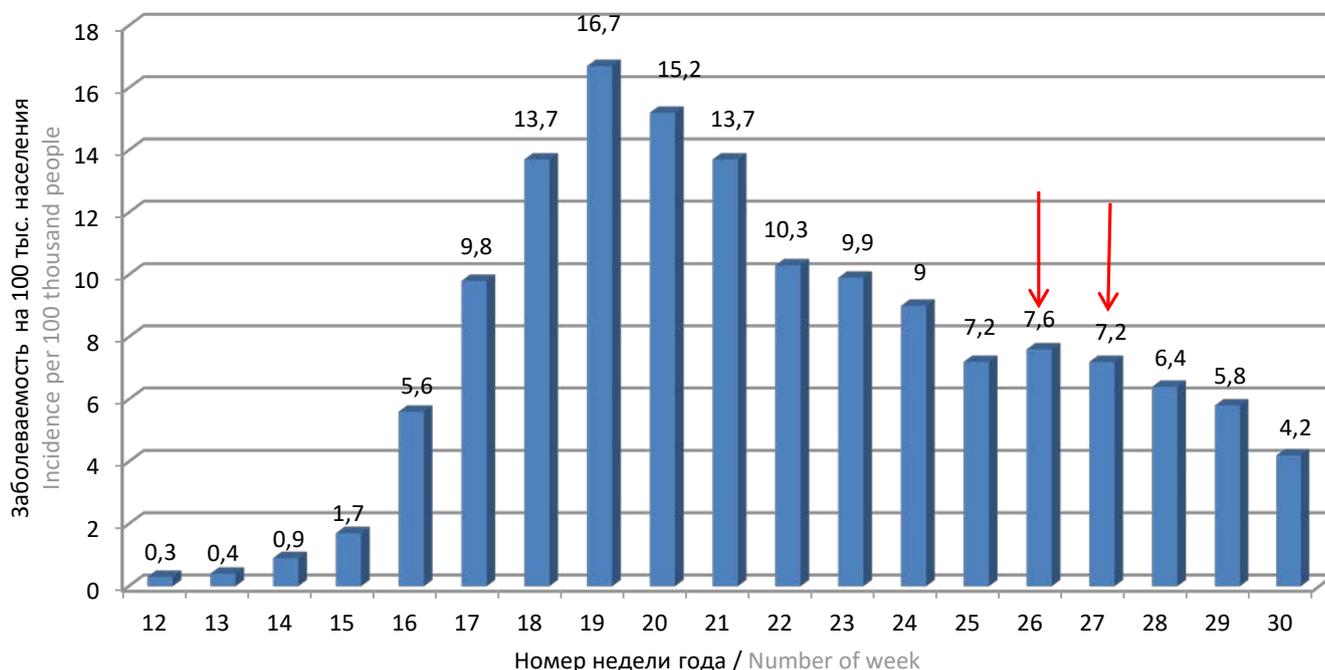


Рис. 1. Динамика заболеваемости COVID-19 жителей Республики Татарстан.

Стрелками отмечена неделя проведения исследования серопревалентности (26.06–05.07.2020).

Fig. 1. Dynamics of the incidence of COVID-19 in the population of the Republic of Tatarstan.

The arrows show the period when the seroprevalence study was conducted (26.06–05.07.2020).

новой инфекции, большое число случаев тяжелого течения, нередко заканчивающегося летальным исходом, побудило ВОЗ 11 февраля 2020 г. объявить пандемию нового заболевания «коронавирусной болезни 2019 года» (COVID-19), этиологическим агентом которого является новый штамм β-коронавируса SARS-CoV-2¹. Пандемия новой вирусной инфекции создала серьезные проблемы для общественного здравоохранения, вызвала панику в обществе, а также масштабный сбой и потери в мировой экономике [2, 3].

По официальным данным Европейского регионального бюро ВОЗ, в Европе по состоянию на 03.08.2020 г. подтверждено 3 403 774 случая COVID-19, из которых 213 677 летальных исходов. Общая кумулятивная заболеваемость составила 365,8, кумулятивная смертность — 229,6, оба значения даны в расчете на 1 млн населения². В Российской Федерации на 04.08.2020 г. выявлено 861 423 заболевших, 661 471 человек выздоровел и 14 351 умер.

В Республике Татарстан первый случай выявлен 16.03.2020 г. у российского гражданина, прибывшего из Франции. В дальнейшем заболеваемость характеризовалась колоколообразным течением с максимумом

4–5 мая 2020 г. с последующим постепенным снижением (рис. 1). Таким образом, исследование серопревалентности, проведенное в период с 26 июня по 5 июля 2020 г., пришлось на период снижения заболеваемости, что в определенной степени могло быть связано с ростом серопревалентности.

Считается, что серопревалентность представляет собой эффективный механизм снижения заболеваемости при любой инфекции, в том числе COVID-19 [4]. Показано, что эпидемическая вспышка прекращается, когда уровень коллективного иммунитета достигает 60–70% всего населения территории, на которой развивается контактное заболевание [5]. Существуют два пути достижения этого порога: спонтанное заражение населения возбудителем, вызвавшим вспышку, и массовая вакцинация [6]. К сожалению, по отношению к COVID-19 оба пути не идеальны: попытка позволить инфекции развиваться спонтанно, заражая восприимчивое население, потребует значительных затрат на лечение и обслуживание больных, а также приведет к увеличению числа осложнений и смертей от COVID-19, особенно среди пациентов с высоким преморбидным риском. Эффективность вакцин против SARS-CoV-2 пока является неопределенной. Остаётся альтернативный способ научиться сосуществовать с коронавирусом, внедряя средства профилактики и лечения COVID-19 по мере их разработки и создания и применяя разумные методы защиты, предупреждаю-

¹ ВОЗ. Выступление Генерального директора ВОЗ на пресс-брифинге по коронавирусной инфекции 2019-nCoV, 11 февраля 2020 г. Available at: <https://www.who.int/ru/dg/speeches/detail/who-director-general-s-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020>

² URL: <https://who.maps.arcgis.com/apps/opsdashboard/index.html#/a19d5d1f86ec4d99b013eed5f637232d>

щие быстрое распространение инфекции и в то же время не сопровождающиеся коллапсированием экономики [6]. Разумеется, подобный подход замедлит формирование серопревалентности, но одновременно сохранит немало жизней. Важным научным направлением в рамках этой парадигмы является всестороннее исследование путей и механизмов формирования популяционного иммунитета, результаты которого могут быть использованы при планировании профилактических мероприятий.

Целью проведенного сероэпидемиологического исследования было определение уровня и структуры популяционного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 среди населения Республики Татарстан на фоне заболеваемости COVID-19.

Материалы и методы

Работа проводилась в рамках широкомасштабной программы Роспотребнадзора по оценке популяционного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 у населения Российской Федерации с учетом протокола, рекомендованного ВОЗ [7]. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера. Перед началом исследования все участники или их юридические представители были ознакомлены с целью, методикой исследования и подписали информированное согласие.

Отбор добровольцев для исследования проводили методом анкетирования и рандомизации. Критерием исключения была активная инфекция COVID-19 в момент анкетирования.

Объем выборки определяли по формуле:

$$n = \frac{t^2 \times p(1-p)}{m^2},$$

где: n — объем выборки;

t — уровень точности (для 95% ДИ $t = 1,96$);

p — оценочная распространенность изучаемого явления (при 50% $p = 0,5$);

m — допустимая ошибка 5% [8].

Расчет объема возрастной группы: $n = 1,962 \times 0,5(1 - 0,5)/0,052 = 384$ человека.

По численности все возрастные группы были сопоставимы и составили от 382 до 461 волонтера. Вся когорта волонтеров включала 926 мужчин и 2000 женщин. Соотношение мужчин и женщин составило 31,6 и 68,4%, т.е. участие женщин в исследовании было в 2,16 раза активнее.

Доля переболевших COVID-19 с диагнозом, установленным в ЛПУ, составила 0,4% (12 человек), а доля волонтеров, имевших признаки ОРЗ в день обследования, — 3,9% (113 человек).

Численность участников каждого района Республики Татарстан находилась в диапазоне 12–960 человек и была пропорциональна численности населения районов.

Пробы крови волонтеров отбирали в вакутейнеры с ЭДТА и обрабатывали методом центрифугирования. Плазму отделяли от клеточных элементов, переносили в пластиковые пробирки и хранили до исследования при 4°C. Содержание антител к SARS-CoV-2 определяли методом ИФА с использованием набора реагентов для анализа сыворотки или плазмы крови человека на наличие специфических иммуноглобулинов класса G к нуклеокапсиду вируса SARS-CoV-2 производства ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора. Результаты учитывали качественным методом и считали положительными при превышении уровня cut-off [7].

Статистическую обработку проводили с использованием методов вариационной статистики с помощью статистического пакета Excel и программного продукта «WinPepi» (версия 11.65). Связь между уровнями заболеваемости и серопревалентности рассчитывали по методу Пирсона. Для оценки достоверности различий сравниваемых показателей использовали уровень вероятности p .

Результаты

Возрастное и географическое распределение серопревалентности среди населения Республики Татарстан

Серопревалентность среди жителей Республики Татарстан в целом составила $31,3 \pm 0,86\%$ (922/2946; **табл. 1**). Максимальная доля серопозитивных была выявлена среди детей в возрасте 7–13 лет ($42,0 \pm 3,9\%$), минимальная — у лиц 70 лет и старше ($24,0 \pm 2,2\%$). Показатель серопревалентности среди мужчин составил $28,5 \pm 1,5\%$, среди женщин — $32,9 \pm 1,05\%$, различия достоверны ($p < 0,05$).

Вероятно, что достоверно низкий уровень серопревалентности у лиц 70 лет и старше можно объяснить меньшей мобильностью или более строгим соблюдением правил изоляции и, соответственно, сниженной вероятностью контакта с носителями вируса SARS-CoV-2. Что касается детей в возрастных группах 7–13 и 14–17 лет, то здесь как раз можно предполагать менее строгое выполнение правил изоляции, а также не исключен гетеротипический иммунитет к другим штаммам β -коронавирусов, в частности к HCoV-OC42 и HCoV-NKU1 [9].

Обследование волонтеров из разных районов Республики Татарстан показало значительную вариабельность данных — от 7,1% (Верхнеуслонский, Новошешминский, Пестречинский районы) до 100% (Муслумовский район). Ввиду малочисленности выборки по Муслумовскому району (21 человек) эти данные носят ориентировочный характер (**табл. 2**).

В районах республики, представленных репрезентативными выборками, максимальная серопре-

Таблица 1. Серопревалентность у жителей Республики Татарстан разных возрастных групп
Table 1. Seroprevalence among residents in the Republic of Tatarstan in different age groups

Возрастная группа, лет Age group, years	Количество обследованных, человек Number of examined people	В том числе Including		Серопревалентность, % ($M \pm m$) Seroprevalence, % ($M \pm m$)
		серопозитивных seropositive	серонегативных seronegative	
1–17	400	157	243	39,25 ± 2,44*
В том числе: Including:	1–6	94	63	33,0 ± 4,85
	7–13	162	94	42,0 ± 3,9*
	14–17	144	86	40,3 ± 4,09*
18–29	400	129	271	32,25 ± 2,34
30–39	448	137	311	30,6 ± 2,17
40–49	461	131	330	28,42 ± 2,1
50–59	448	154	294	34,4 ± 2,24
60–69	402	121	261	30,1 ± 2,4
70 и старше 70 years and older	387	93	294	24,0 ± 2,2*
Итого Total	2946	922	2024	31,3 ± 0,86

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению со среднепопуляционным уровнем серопревалентности.
Note. * $p < 0,05$: differences from the average population seroprevalence level.

валентность выявлена в Арском районе (серопозитивность — $74,3 \pm 7,4\%$; заболеваемость — 136,4 на 100 тыс. населения; $n = 35$), минимальная — в Заинском районе (серопозитивность — $8,6 \pm 4,7\%$; заболеваемость — 8,2 человека на 100 тыс. населения; $n = 35$). Учитывая, что это два близких по населению района, но с разной серопозитивностью и заболеваемостью, был проведен корреляционный анализ между заболеваемостью, выраженной на 100 тыс. населения, и серопревалентностью (в %). При оценке сплошного массива данных по районам коэффициент корреляции составил $-0,14$. Корреляционная связь отсутствует. Для получения более достоверного результата из расчетного массива были исключены все районы с нерепрезентативной выборкой ($n < 30$). После повторного расчета исчисленный коэффициент корреляции (r_c) составил $0,486$, связь достоверна при $p < 0,05$ (рис. 2).

Уровень сероконверсии у лиц, переболевших или имевших контакт с больными COVID-19

В процессе жизнедеятельности в период заболевания COVID-19 возможно несколько видов контакта человека с вирусом SARS-CoV-2: бытовой или производственный контакт с больным, реконвалесцентом или носителем вируса. В основательном обзоре К.А. Walsh и соавт. [10] указывается, что клиническая излеченность после COVID-19 — еще не признак полного отсутствия риска заражения окру-

жающих. Считается, что вирус у реконвалесцентов может выделяться в течение продолжительного времени, заражая окружающих. При этом совсем не обязательно, что подобное заражение непременно закончится появлением клинической симптоматики. До 90% инфицированных могут переносить заболевание в бессимптомной форме, причем часть из них способна выделять вирус в окружающую среду, даже не догадываясь об этом. Проявлением такой скрытой инфекции может быть серопревалентность [11].

Среди лиц, имевших бытовой и/или производственный контакт с переболевшими COVID-19, серопозитивность составила $37,0 \pm 3,2\%$, а при отсутствии подобных контактов — $31,0 \pm 0,9\%$, различия достоверны при $p < 0,05$.

Другая группа волонтеров имела в анамнезе клиническую форму COVID-19. Эта группа была невелика по численности и включала всего 12 человек. Доля серопревалентных среди них составила $83,3 \pm 10,8\%$, а при отсутствии данных о перенесенной инфекции — $31,3 \pm 0,9\%$ ($p < 0,05$).

Третья группа — лица, у которых получены положительные результаты ПЦР, что в отсутствие других симптомов может указывать на abortивную форму течения COVID-19. Доля лиц с антителами к SARS-CoV-2 в этой группе составила 100%. Однако следует отметить, что группа включала всего 8 человек, что явно недостаточно для какого-

Таблица 2. Уровень серопревалентности среди жителей Республики Татарстан, проживающих в разных районах
Table 2. Level of seroprevalence among residents of the Republic of Tatarstan living in different districts

Район District	Число обследованных, человек The number of examined people	В том числе Including		Серопревалент- ность, % ($M \pm m$) Seroprevalence, % ($M \pm m$)	Заболеваемость на 100 тыс. населения Morbidity per 100 thousand population
		серопозитивных seropositive	серонегативных seronegative		
Агрызский Agryzsky	28	8	20	28,6 ± 8,5	29,1
Азнакаевский Aznakaevsky	63	16	47	25,4 ± 5,5	21,7
Аксубаевский Aksubaevsky	20*	2	18	10,0 ± 6,7	81,7
Актанышский Aktanyshkiy	21*	7	14	33,3 ± 10,3	28,5
Алексеевский Aleksseevsky	14*	3	11	21,4 ± 10,9	25,8
Алькеевский Alkeevsky	14*	10	4	71,4 ± 12,1	95,4
Альметьевский Al'metyevsky	161	34	127	21,1 ± 3,2	23,8
Апастовский Apastovsky	0	0	0	0	362,0
Арский Arsky	35	26	9	74,3 ± 7,4	136,4
Атнинский Atninsky	13*	7	6	53,8 ± 13,8	470,3
Бавлинский Bavlinsky	28*	4	24	14,3 ± 6,6	9,5
Балтасинский Baltasinsky	28*	4	24	14,3 ± 6,6	121,4
Бугульминский Bugul'minsky	70	7	63	10,0 ± 3,6	2,0
Буинский Buinsky	34	25	9	73,5 ± 7,6	123,0
Верхнеуслонский Verkhneuslonsky	14*	1	13	7,1 ± 6,7	121,4
Высокогорский Vysokogorsky	49	25	24	51,0 ± 7,1	249,1
Дрожжановский Drozhdzhanovsky	21*	2	19	9,5 ± 6,4	420,4
Елабужский Yelabuzhsky	54	23	31	42,6 ± 6,7	62,7
Заинский Zainky	35	3	32	8,6 ± 4,7	8,2
Зеленодольский Zelenodol'sky	112	42	70	37,5 ± 4,6	97,7
Казань Kazan'	980	292	688	29,7 ± 1,75	177,3
Кайбицкий Kaybitsky	14*	11	3	78,6 ± 10,7	59,6
Камско-Устьинский Kamsko-Ust'insky	14*	0	14	0	86,6
Кукморский Kukmorsky	40	23	17	57,5 ± 7,8	53,4

Окончание табл. 2.

End of Table 2.

Район District	Число обследованных, человек The number of examined people	В том числе Including		Серопревалент- ность, % ($M \pm m$) Seroprevalence, % ($M \pm m$)	Заболеваемость на 100 тыс. населения Morbidity per 100 thousand population
		серопозитивные seropositive	серонегативные seronegative		
Лаишевский Laishevsky	28*	16	12	57,1 ± 9,3	275,6
Лениногорский Leninogorsky	56	24	32	42,9 ± 6,6	22,0
Мамадышский Mamadyshsky	28*	16	12	57,1 ± 9,3	56,0
Менделеевский Mendeleevsky	28*	16	12	57,1 ± 9,3	37,3
Мензелинский Menzelinsky	21*	6	15	28,6 ± 9,8	19,7
Муслюмовский Musljumovsky	21*	21	0	100	10,2
Набережные Челны Naberezhnye Chelny	431	106	325	24,6 ± 2,0	133,0
Нижнекамский Nizhnekamsky	189	36	153	19,0 ± 2,8	81,2
Новошешминский Novosheshminsky	14*	1	13	7,1 ± 6,8	39,3
Нурлатский Nurlatsky	42	24	18	57,1 ± 7,6	55,9
Пестречинский Pestrechinsky	28*	2	26	7,1 ± 4,8	253,1
Рыбно-Слободский Rybno-Slobodsky	14*	4	10	28,6 ± 12,1	61,5
Сабинский Sabinsky	19*	14	5	73,7 ± 10,1	142,1
Сармановский Sarmanovsky	21*	0	21	0	57,6
Спасский Spassky	12*	5	7	41,7 ± 14,2	24,4
Тетюшский Tetyushsky	14*	7	7	50,0 ± 13,3	116,0
Тукаевский Tukaevsky	21*	8	13	38,1 ± 10,6	131,2
Тюлячинский Tyulyachinskiy	14*	9	5	64,3 ± 12,8	256,2
Черемшанский Cheremshansky	14*	11	3	78,6 ± 10,9	47,8
Чистопольский Chistopol'sky	56	16	40	28,6 ± 6,0	16,0
Ютазинский Yutazinsky	13*	5	8	38,4 ± 13,5	30,5
Итого Total	2946	922	2024	31,3 ± 0,8	119,8

Примечание. Звездочкой отмечены районы с малой выборкой. Полученные по этим районам результаты не являются репрезентативными и носят ориентировочный характер.

Note. Areas with a small sample size are marked with asterisk. The results obtained for these areas are not representative and are indicative.

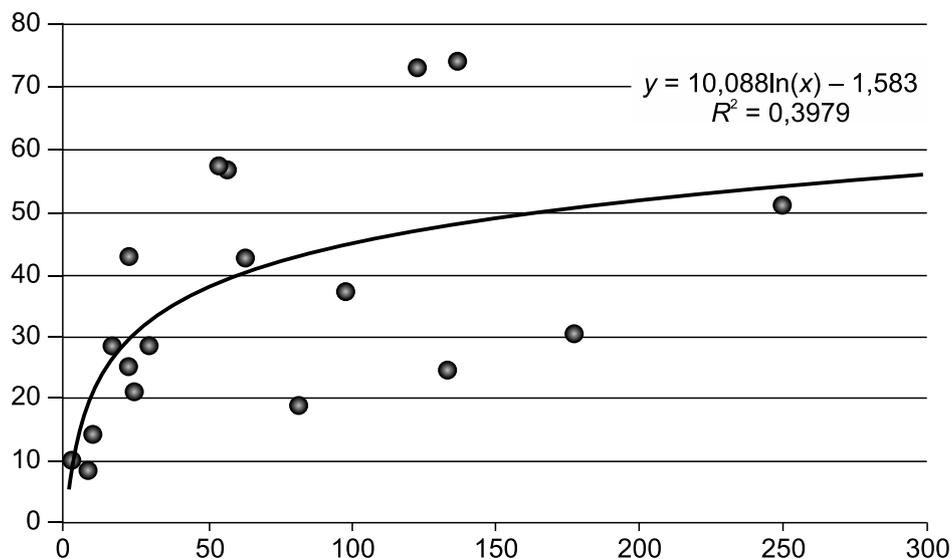


Рис. 2. Корреляционная связь по Пирсону между заболеваемостью COVID-19 и серопревалентностью.

По оси ординат — серопревалентность, %; по оси абсцисс — заболеваемость на 100 тыс. населения.
Вычисленный коэффициент корреляции (r_c) = 0,4866; $p < 0,05$.

Fig. 2. Pearson correlation between the incidence rate of COVID-19 and seroprevalence.

Y-axis shows seroprevalence, %; X-axis shows the incidence per 100 thousand people.
Calculated correlation coefficient (r_c) = 0.4866; $p < 0.05$.

либо вывода. Эти результаты могут рассматриваться только как ориентировочные. В группе с отрицательной ПЦР доля серопозитивных составила $36,6 \pm 2,8\%$.

Последняя группа обследованных — лица, имевшие признаки острых респираторных заболеваний (ОРЗ) в момент обследования ($n = 113$). Доля сероположительных в этой группе составила $39,8 \pm 4,7\%$, остальные волонтеры не имели клинических проявлений ОРЗ и, соответственно, доля лиц с выявленными специфическими антителами к SARS-CoV-2 среди них — $31,2 \pm 0,9\%$ ($p < 0,05$). Можно предположить, что у части больных ОРЗ имел место гетеротипический иммунитет, вызванный другими β -коронавирусами человека, имеющими общие детерминанты с нуклеопротеином SARS-CoV-2 [8].

Оценка доли бессимптомных форм

Для расчета распространенности бессимптомных форм среди серопозитивных лиц вычисляли долю лиц, у которых отсутствует хотя бы один признак: диагноз COVID-19, либо положительная ПЦР, либо симптомы ОРВИ. Диапазон составил от $90,5 \pm 2,5\%$ до 100% (табл. 3). Достоверных межгрупповых различий в этой серии исследований не выявлено.

Таким образом, как и в других регионах России, абсолютное число серопозитивных лиц демонстрируют бессимптомное течение. Поскольку серопозитивность обусловлена, но не обязательно связана с циркуляцией РНК вируса, можно с некоторой уверенностью предполагать, что бессим-

птомное течение COVID-19 представляет собой фактор, увеличивающий способность популяции противостоять инвазии патогенного возбудителя и тем самым ведущий к снижению эпидемической напряженности в популяции.

Обсуждение

Результаты обследования населения Республики Татарстан показали достаточно высокую долю серопревалентных лиц среди населения — $31,3 \pm 0,86\%$, что существенно выше, чем в Санкт-Петербурге ($26,0 \pm 0,8\%$) [7] или Ленинградской области ($20,7 \pm 0,7\%$) [12]. Как и в других регионах (Санкт-Петербург и Ленинградская область) [11, 12], наиболее высокая серопревалентность была отмечена среди детей. В настоящее время не представляется возможным дать исчерпывающее объяснение данной особенностью, можно лишь предположить, что определенное влияние на становление антительного коронавирусного пейзажа у детей оказывают перекрестные антитела, появляющиеся в результате ОРВИ, вызванных другими типами β -коронавирусов, имеющих общие детерминанты в нуклеокапсидных белках [9]. Среди других возрастных групп обращает на себя внимание достоверное снижение серопревалентности среди лиц в возрасте 70 лет и старше ($24,0\%$). Можно предположить, что эта особенность в некоторой степени связана с меньшей мобильностью этой группы населения или с более строгим соблюдением режима изоляции. При анализе связи между серопревалентностью и заболеваемостью достоверной зависимости выявить не удалось, однако отме-

Таблица 3. Доля лиц с бессимптомным течением инфекции из общего числа серопозитивных жителей разных возрастных групп Республики Татарстан

Table 3. The proportion of people with asymptomatic infection from the total number of seropositive residents in different age groups of the Republic of Tatarstan

Возрастная группа, лет Age group, years	Число серопозитивных, человек The number of seropositive persons	Число лиц с бессимптомным течением The number of asymptomatic persons	Доля лиц с бессимптомным течением, % ($M \pm m$) The proportion of persons with asymptomatic infection, % ($M \pm m$)
1–17	157	155	98,7 ± 0,9
18–29	129	126	97,7 ± 1,3
30–39	137	124	90,5 ± 2,5
40–49	131	120	91,6 ± 2,4
50–59	154	140	90,9 ± 2,3
60–69	121	113	93,4 ± 2,3
70 и более 70 and more	93	93	100,0
Итого Total	922	871	94,5 ± 0,8

чена явная тенденция с коэффициентом корреляции 0,32. Регрессионный анализ показал, что эта тенденция описывается логарифмической зависимостью, описываемой с помощью уравнения:

$$y = 8,0131 \ln(x) + 8,6848.$$

Среди других показателей серопревалентности не выявлено необычных фактов. Как и ожидалось, достоверно высокий уровень серопозитивности был у реконвалесцентов после перенесенной COVID-19. Сероконверсия в 100%, обнаруженная среди носителей РНК вируса, имеющих позитивный результат ПЦР, вероятно, объясняется малым числом наблюдений.

Что касается бессимптомных форм, то обращает на себя внимание высокий уровень носительства. Можно предположить две вероятности, лежащие в основе этого явления: с одной стороны, это характерный признак SARS-CoV-2 [13], с другой стороны, нельзя исключать инapparантной сероконверсии, при которой даже в отсутствие манифестной формы инфекции может развиваться гуморальный иммунный ответ [14, 15].

Выводы

1. Коллективный иммунитет совокупного населения Республики Татарстан составил 31,3%.

2. После инфекции COVID-19 антитела обнаруживаются в 83,3% случаев.

3. У лиц с позитивным результатом ПЦР-анализа, полученным ранее, антитела выявлялись в 100% случаев, однако эти данные имеют низкую репрезентативность из-за недостаточной выборки.

4. Уровень заболеваемости COVID-19 связан с серопревалентностью к вирусу SARS-CoV-2.

5. Доля бессимптомных форм инфекции среди серопозитивных жителей Республики Татарстан в целом составила 94,5%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Faust J.S., del Rio C. Assessment of Deaths from COVID-19 and from Seasonal Influenza. *JAMA Intern. Med.* 2020; 180(8): 1045–6. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2020.2306>
2. Nicomedes C.J.C., Avila R.M.A. An analysis on the panic during COVID-19 pandemic through an online form. *J. Affect. Disord.* 2020; 276: 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2020.06.046>
3. Lenzen M., Li M., Malik A., Pomponi F., Sun Y.Y., Wiedmann T., et al. Global socio-economic losses and environmental gains from the Coronavirus pandemic. *PLoS One.* 2020; 15(7): e0235654. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235654>
4. Randolph H.E., Barreiro L.B. Herd immunity: understanding COVID-19. *Immunity.* 2020; 52(5): 737–41. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.04.012>
5. Gomes M.G.M., Corder R.M., King J.G., Langwig K.E., Souto-Maior C., Carneiro J., et al. Individual variation in susceptibility or exposure to SARS-CoV-2 lowers the herd immunity threshold. *medRxiv.* Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.04.27.20081893>
6. Robison D., Lhermie G. Living with COVID-19: A systemic and multi-criteria approach to enact evidence-based health policy. *Front. Public Health.* 2020; 8: 294.
7. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Башкетова Н.С., Фридман Р.К., Лялина Л.В. и др. Популяционный иммунитет к вирусу SARS-CoV-2 среди населения Санкт-Петербурга в активную фазу эпидемии COVID-19. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2020; 3: 124–130. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-124-130
8. Newcombe R.G. Two-sided confidence intervals for the single proportion: comparison of seven methods. *Stat. Med.* 1998; 17(8): 857–87. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0258\(19980430\)17:8%3C857::aid-sim777%3E3.0.co;2-e](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0258(19980430)17:8%3C857::aid-sim777%3E3.0.co;2-e)
9. Ng K., Faulkner N., Cornish G., Rosa A., Earl C., Wrobel A., et al. Preexisting and *de novo* humoral immunity to SARS-CoV-2 in humans. *Science.* 2020; eabe1107. <https://doi.org/10.1126/science.abe1107>

- Walsh K.A., Jordan K., Clyne B., Rohde D., Drummond L., Byrne P., et al. SARS-CoV-2 detection, viral load and infectivity over the course of an infection. *J. Infect.* 2020; 81(3): 357–71. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.06.067>
- Okba N.M.A., Müller M.A., Li W., Wang C., Kessel C.H.G., Corman V.M., et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 — specific antibody responses in coronavirus disease patients. *Emerg. Infect. Dis.* 2020; 26(7): 1478–88. <https://doi.org/10.3201/eid2607.200841>
- Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Историк О.А., Мосевич О.С., Лялина Л.В. и др. Опыт оценки популяционного иммунитета к SARS-CoV-2 среди населения Ленинградской области в период эпидемии COVID-19. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2020; 3:114–123. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-114-123.
- Cai J., Sun W., Huang J., Gamber M., Wu J., He G. Indirect virus transmission in cluster of COVID-19 cases, Wenzhou, China, 2020. *Emerg. Infect. Dis.* 2020; 26(6): 1343–5. <https://doi.org/10.3201/eid2606.200412>
- Смирнов В.С., Зарубаев В.В., Петленко С.В. *Биология возбудителей и контроль гриппа и ОРВИ.* СПб.: Гиппократ; 2020.
- Huang A.T., Garcia-Carreras B., Hitchings M.D., Yang B., Katzelnick L.C., Rattigan S.M., et al. A systematic review of antibody mediated immunity to coronaviruses: antibody kinetics, correlates of protection, and association with severity. *Nat. Commun.* 2020; 11(1): 4704. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18450-4>
- Robison D., Lhermie G. Living with COVID-19: A systemic and multi-criteria approach to enact evidence-based health policy. *Front. Public Health.* 2020; 8: 294.
- Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Mel'nikova A.A., Bashketova N.S., Fridman R.K., Lyalina L.V., et al. Population immunity to the SARS-CoV-2 virus among the population of St. Petersburg in the active phase of the COVID-19 epidemic. *Problemy osobo opasnykh infektsii.* 2020; 3: 124–130. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-124-130 (in Russian).
- Newcombe R.G. Two-sided confidence intervals for the single proportion: comparison of seven methods. *Stat. Med.* 1998; 17(8): 857–87. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0258\(19980430\)17:8%3C857::aid-sim777%3E3.0.co;2-e](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0258(19980430)17:8%3C857::aid-sim777%3E3.0.co;2-e)
- Ng K., Faulkner N., Cornish G., Rosa A., Earl C., Wrobel A., et al. Preexisting and de novo humoral immunity to SARS-CoV-2 in humans. *Science.* 2020; eabe1107. <https://doi.org/10.1126/science.abe1107>
- Okba N.M.A., Müller M.A., Li W., Wang C., Kessel C.H.G., Corman V.M., et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 — specific antibody responses in coronavirus disease patients. *Emerg. Infect. Dis.* 2020; 26(7): 1478–88. <https://doi.org/10.3201/eid2607.200841>
- Walsh K.A., Jordan K., Clyne B., Rohde D., Drummond L., Byrne P., et al. SARS-CoV-2 detection, viral load and infectivity over the course of an infection. *J. Infect.* 2020; 81(3): 357–71. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.06.067>
- Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Mel'nikova A.A., Istorik O.A., Mosevich O.S., Lyalina L.V., et al. Experience in assessing population immunity to SARS-CoV-2 among the population of the Leningrad region during the COVID-19 epidemic. *Problemy osobo opasnykh infektsii.* 2020; 3:114–123. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-114-123 (In Russian).
- Cai J., Sun W., Huang J., Gamber M., Wu J., He G. Indirect virus transmission in cluster of COVID-19 cases, Wenzhou, China, 2020. *Emerg. Infect. Dis.* 2020; 26(6): 1343–5. <https://doi.org/10.3201/eid2606.200412>
- Smirnov V.S., Zarubaev V.V., Petlenko S.V. *Biology of Pathogens and Control of Influenza and SARS [Biologiya vozбудителей i kontrol' grippa i ORVI].* St. Petersburg: Gippokrat; 2020. (in Russian)
- Huang A.T., Garcia-Carreras B., Hitchings M.D., Yang B., Katzelnick L.C., Rattigan S.M., et al. A systematic review of antibody mediated immunity to coronaviruses: antibody kinetics, correlates of protection, and association with severity. *Nat. Commun.* 2020; 11(1): 4704. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18450-4>

REFERENCES

- Faust J.S., del Rio C. Assessment of Deaths from COVID-19 and from Seasonal Influenza. *JAMA Intern. Med.* 2020; 180(8): 1045–6. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2020.2306>
- Nicomedes C.J.C., Avila R.M.A. An analysis on the panic during COVID-19 pandemic through an online form. *J. Affect. Disord.* 2020; 276: 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2020.06.046>
- Lenzen M., Li M., Malik A., Pomponi F., Sun Y.Y., Wiedmann T., et al. Global socio-economic losses and environmental gains from the Coronavirus pandemic. *PLoS One.* 2020; 15(7): e0235654. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235654>
- Randolph H.E., Barreiro L.B. Herd immunity: understanding COVID-19. *Immunity.* 2020; 52(5): 737–41. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.04.012>
- Gomes M.G.M., Corder R.M., King J.G., Langwig K.E., Souto-Maior C., Carneiro J., et al. Individual variation in susceptibility or exposure to SARS-CoV-2 lowers the herd immunity threshold. *medRxiv.* Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.04.27.20081893>

Информация об авторах

Попова Анна Юрьевна — д.м.н., проф., руководитель Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 127994, Москва, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2567-9037>.

Ежлова Елена Борисовна — к.м.н., зам. руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 127994, Москва, Россия.

Мельникова Альбина Андреевна — к.м.н., зам. начальника Управления эпидемиологического надзора Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 127994, Москва, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5651-1331>.

Патяшина Мария Александровна — руководитель Управления Роспотребнадзора по Республике Татарстан, 420111, Казань, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6302-3993>.

Information about the authors

Anna Yu. Popova — D. Sci. (Med.), Prof., Head, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 127994, Moscow, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2567-9037>.

Elena B. Ezhlova — Cand. Sci. (Med.), Deputy Head, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 127994, Moscow, Russia.

Albina A. Melnikova — Cand. Sci. (Med.), Deputy Head, Epidemiological surveillance department, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 127994, Moscow, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5651-1331>.

Marina A. Patyashina — Head, Department of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing for Tatarstan Republic, 420111, Kazan, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6302-3993>.

Сизова Елена Петровна — главный врач ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии по Республике Татарстан», 420061, Казань, Россия.

Юзлибаева Лилия Рустемовна — нач. отдела эпидемического надзора Управления Роспотребнадзора по Республике Татарстан, 420111, Казань, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8082-0302>.

Лялина Людмила Владимировна — д.м.н., проф., зав. лаб. эпидемиологии инфекционных и неинфекционных заболеваний ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, 197101, Санкт-Петербург, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9921-3505>.

Смирнов Вячеслав Сергеевич[✉] — д.м.н., проф., в.н.с. ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, 197101, Санкт-Петербург, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2723-1496>.

E-mail: vssmi@mail.ru

Бадамшина Гульнара Галимяновна — зав. отд. микробиологических исследований ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии по Республике Татарстан», 420061, Казань, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0088-6422>.

Гончарова Анна Валерьевна — зав. лаб. особо опасных и вирусных инфекций ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии по Республике Татарстан», 420061, Казань, Россия.

Арбузова Татьяна Владимировна — м.н.с. группы эпидемиологического мониторинга и прогнозирования ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, 197101, Санкт-Петербург, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3074-8656>.

Ломоносова Валерия Игоревна — лаборант-исследователь лаб. эпидемиологии инфекционных и неинфекционных заболеваний ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, 197101, Санкт-Петербург, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4531-2724>.

Тололян Арег Артемович — д.м.н., проф., академик РАН, директор ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, 197101, Санкт-Петербург, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4571-8799>.

E-mail: pasteur@pasteur.org.ru

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Elena P. Sizova — chief physician, Center for Hygiene and Epidemiology in Tatarstan Republic, 420061, Kazan, Russia.

Lilia R. Yuzlibaeva — Head, Epidemic surveillance department, Department of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing for Tatarstan Republic, 420011, Kazan, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8082-0302>.

Lyudmila V. Lyalina — D. Sci. (Med.), Prof., Head, Laboratory of epidemiology of infectious and non-infectious diseases, Saint Petersburg Pasteur Institute, 197101, St. Petersburg, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9921-3505>.

Vyacheslav S. Smirnov[✉] — D. Sci. (Med.), Prof., leading researcher, Saint Petersburg Pasteur Institute, 197101, St. Petersburg, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2723-1496>.

E-mail: vssmi@mail.ru

Gulnara G. Badamshina — Head, Department of microbiological research, Center for Hygiene and Epidemiology in Tatarstan Republic, 420061, Kazan, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0088-6422>.

Anna V. Goncharova — Head, Laboratory for especially dangerous and viral infections, Center for Hygiene and Epidemiology in Tatarstan Republic, 420061, Kazan, Russia.

Tatiana V. Arbuzova — junior researcher, Epidemiological monitoring and forecasting group, Saint Petersburg Pasteur Institute, 197101, St. Petersburg, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3074-8656>.

Valeria I. Lomonosova — research assistant, Laboratory of epidemiology of infectious and non-infectious diseases, Saint Petersburg Pasteur Institute, 197101, St. Petersburg, Russia.

Areg A. Totolian — D. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, Director, Saint Petersburg Pasteur Institute, 197101, St. Petersburg, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4571-8799>.

Contribution: the authors contributed equally to this article.



Чувствительность биопленок вакцинных и свежесыведенных штаммов *Bordetella pertussis* к антибиотикам

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

ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Цель. Изучение чувствительности биопленок вакцинных и свежесыведенных штаммов *Bordetella pertussis* к антибиотикам.

Материалы и методы. Использованы вакцинные и свежесыведенные штаммы *B. pertussis*. В качестве инокулята для получения биопленок использовали культуры штаммов, выращенные на плотной питательной среде. Интенсивность образования биопленок в круглодонных полистироловых 96-луночных планшетах оценивали окрашиванием 0,1% раствором генцианвиолета. В опытах использовали антибиотики следующих групп: пенициллины (ампициллин), цефалоспорины (цефтриаксон), аминогликозиды (гентамицин), макролиды (эритромицин).

Результаты. Наиболее высокой устойчивостью к антибиотикам отличались вакцинный штамм № 305 и свежесыведенный штамм № 211, проявлявшие чувствительность только к эритромицину. Вакцинный штамм № 703 был чувствителен к гентамицину и ампициллину и проявлял резистентность к эритромицину и цефтриаксону. Вакцинный штамм № 475 был чувствителен ко всем испытанным антибиотикам. Штамм Tohama 1 был резистентен к ампициллину и чувствителен к остальным антибиотикам. Свежесыведенные штаммы № 178 и № 162 были устойчивы к цефтриаксону и чувствительны к гентамицину, эритромицину и ампициллину. Минимальные подавляющие концентрации использованных антибиотиков составляли 0,2–5 мкг/мл.

Заключение. Приведенные данные свидетельствуют о гетерогенности вакцинных и свежесыведенных штаммов *B. pertussis* по чувствительности к антибиотикам. Наибольшую активность проявлял эритромицин, подавлявший рост биопленок 6 из 7 штаммов. Наименее эффективным был цефтриаксон, подавлявший рост биопленок только 2 штаммов.

Ключевые слова: штаммы *Bordetella pertussis*; биопленки; чувствительность к антибиотикам.

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

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

Для цитирования: Зайцев Е.М., Брицина М.В., Озерецковская М.Н., Мерцалова Н.У., Бажанова И.Г. Чувствительность биопленок вакцинных и свежесыведенных штаммов *Bordetella pertussis* к антибиотикам. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(6): 529–534.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-6-3>

Поступила 22.10.2019
Принята в печать 30.06.2020

Sensitivity of biofilms of vaccine and freshly isolated *Bordetella pertussis* strains to antibiotics

Eugene M. Zaytsev[✉], Marina V. Britsina, Maria N. Ozeretskovskaya, Natalia U. Mertsalova, Irina G. Bazhanova

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

Aim. To study the sensitivity of biofilms of vaccine and freshly isolated strains of *Bordetella pertussis* to antibiotics.

Materials and methods. Vaccine and freshly isolated strains of *B. pertussis* were used. Cultures of strains grown on dense nutrient medium were used as inoculate for biofilms production. The intensity of biofilm formation in round-bottomed polystyrene 96-well plates was estimated by staining with 0.1% gentian-violet solution. The following antibiotics were used in experiments: penicillins (ampicillin), cephalosporins (ceftriaxone), aminoglycosides (gentamicin), macrolides (erythromycin).

Results. The highest resistance to antibiotics was demonstrated by the vaccine strain No. 305 and freshly isolated strain No. 211, sensitive only to erythromycin. Vaccine strain No. 703 was sensitive to gentamicin and ampicillin and showed resistance to erythromycin and ceftriaxone. Vaccine strain No. 475 was sensitive to all tested

antibiotics. The Tohama 1 strain was resistant to ampicillin and sensitive to other antibiotics. Freshly isolated strains No. 178 and No. 162 were resistant to ceftriaxone and sensitive to gentamicin, erythromycin and penicillin. Minimal inhibitory concentrations of tested antibiotics ranged from 0.2 µg/ml to 5.0 µg/ml.

Conclusion. These data indicate the heterogeneity of vaccine and freshly isolated strains of *B. pertussis* in sensitivity to antibiotics. The greatest activity was shown by erythromycin, which suppressed the growth of biofilms of 6 out of 7 strains. The least effective was ceftriaxone, which suppressed the growth of biofilms of only 2 strains.

Keywords: *Bordetella pertussis* strains; biofilms; antibiotic sensitivity.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

For citation: Zaytsev E.M., Britsina M.V., Ozeretskovskaya M.N., Mertsalova N.U., Bazhanova I.G. Sensitivity of biofilms of vaccine and freshly isolated *Bordetella pertussis* strains to antibiotics. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(6): 529–534. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-6-3>

Received 22 October 2019

Accepted 30 June 2020

Введение

Эпидемический процесс коклюшной инфекции, несмотря на высокий уровень противокклюшной вакцинации, продолжается во многих странах мира. Ежегодно в мире регистрируется около 50 млн случаев заболевания коклюшем, около 300 тыс. детей погибает от него [1, 2]. Одной из вероятных причин роста заболеваемости коклюшем являются мутации в генах возбудителя, кодирующих основные факторы вирулентности *Bordetella pertussis*, что привело к появлению циркулирующих штаммов, отличающихся повышенной вирулентностью [3].

Фармакотерапия больных коклюшем остается актуальной проблемой и включает назначение этиотропных, патогенетических и симптоматических препаратов. Ведущую роль в этиотропном лечении играют антибактериальные средства, прежде всего антибиотики. Наиболее эффективными принято считать антибиотики макролидного ряда: эритромицин, азитромицин, кларитромицин. Вместе с тем для лечения коклюша, в частности при неэффективности эритромицина, с успехом использовались и другие антибиотики (тетрациклинового ряда, пенициллины, аминогликозиды, цефалоспорины и др.) [4]. Главными условиями эффективности антибиотикотерапии коклюша являются правильный выбор антибиотика, его дозировка и длительность лечения. Чувствительность коклюшного микроба к антибиотикам в настоящее время оценивают в бульонных или агаровых культурах методами серийных разведений или с помощью диско-диффузионных методов. Однако в последние годы было установлено, что *B. pertussis*, как и другие виды бактерий, функционируют в виде биопленок на биотических и абиотических субстратах [5, 6]. Биопленочные формы бактерий отличаются от планктонных измененным спектром экспрессии генов и обладают повышенной устойчивостью к факторам внешней среды, в частности к антибиотикам. Установлено, что биопленки разных микроорганизмов могут быть в

100–1000 раз более устойчивы к антибиотикам, чем планктонные культуры [7]. Чувствительность биопленок *B. pertussis* к антибиотикам пока изучена недостаточно, по данной проблеме имеются лишь единичные публикации [8].

Цель работы заключалась в изучении чувствительности биопленок вакцинных и свежeweделенных штаммов *B. pertussis* к антибиотикам разных групп.

Материалы и методы

В опытах использовали две группы штаммов *B. pertussis*. Первую группу составили вакцинные штаммы, выделенные от больных коклюшем в 1950–1960-е гг., используемые в России для изготовления корпускулярных коклюшных вакцин: штамм № 475 (серовар 1.2.3), штамм № 305 (серовар 1.2.0), штамм № 703 (серовар 1.0.3), а также штамм Tohama 1 (серовар 1.2.0), выделенный в 1950-е гг. в Японии и широко использующийся в ряде стран при проведении генетических исследований и производстве коклюшных вакцин. Во вторую группу были включены штаммы, выделенные в РФ от больных коклюшем в 2001–2010 гг.: штамм № 178 (серовар 1.2.0), штамм № 162 (серовар 1.0.3) и штамм № 211 (серовар 1.2.3) [9]. В опытах использовали антибиотики групп пенициллинов (ампициллин), цефалоспоринов (цефтриаксон), аминогликозидов (гентамицин), макролидов (эритромицин).

В качестве инокулята для получения биопленок применяли ночные культуры штаммов, выращенных на плотной питательной среде «Бордетел-агар» (Питательная среда для культивирования и выделения коклюшного микроба сухая, ФБУН ГНЦ ПМБ). Для получения биопленок суспензию бактерий культивировали в 96-луночных пластиковых планшетах («Nunc») в жидкой синтетической питательной среде в соответствии с ранее описанным методом [9]. Культуры штаммов в жидкой синтетической питательной среде в концентрации 1,25, 2,5

и 5,0 международных оптических единиц (МОЕ) в объеме 100 мкл вносили в лунки планшетов. После этого в лунки вносили по 100 мкл питательной среды, содержащей испытуемые антибиотики в концентрации 0,2, 1 и 5 мкг/мл. В контрольные пробы антибиотики не добавляли.

После окрашивания био пленок в планшетах 0,1% раствором генцианвиолета оценивали их интенсивность по отношению оптической плотности (ОП) окрашенного растворителя био пленки к негативному контролю (ОП питательной среды = $0,048 \pm 0,003$). Выделяли следующие группы: плотные (ОП > 0,192), умеренные ($0,096 < \text{ОП} \leq 0,192$) био пленки, слабые/отсутствие био пленок ($\text{ОП} \leq 0,096$) [9].

Результаты оценивали по значениям минимальной подавляющей концентрации (МПК, мкг/мл), которую определяли как минимальную концентрацию антибиотиков, подавляющую рост био пленочных культур. Для достоверного обсчета результатов использовали 4 лунки на один опытный образец и рассчитывали среднюю величину ОП опытного образца и удвоенную ошибку. Сравнения проводили по критерию Стьюдента [10].

Результаты

Результаты исследования чувствительности вакцинных и свежeweделенных штаммов *B. pertussis* к антибиотикам приведены в **таблице**. Для определения МПК антибиотиков необходимо было выбрать оптимальную стартовую посевную дозу микробных клеток.

Контрольные культуры исследованных штаммов различались по интенсивности образования био пленок в зависимости от посевной дозы. При посевной дозе 5 МОЕ 5 из 7 штаммов формировали плотные био пленки, а 2 штамма — умеренные. При посевной дозе 2,5 МОЕ плотные био пленки формировали 2 штамма, а 5 штаммов — умеренные. При дозе 1,25 МОЕ только 1 штамм формировал плотную био пленку, а остальные 6 — умеренные или слабые. В связи с этим чувствительность штаммов к антибиотикам оценивали при посевной дозе 5 МОЕ/мл. Вакцинный штамм Tohama 1 проявлял чувствительность к гентамицину и эритромицину с МПК 5 мкг/мл и цефтриаксону с МПК 1 мкг/мл. По отношению к ампициллину этот штамм был устойчивым с ростом умеренных био пленок с МПК 0,2 и 1 мкг/мл и слабых био пленок — с 5 мкг/мл. Вакцинный штамм № 475 был чувствительным к гентамицину с МПК 0,2 мкг/мл, а также к эритромицину, цефтриаксону и ампициллину с МПК 5 мкг/мл. Вакцинный штамм № 305 был чувствителен только к эритромицину с МПК 5 мкг/мл и устойчив к остальным трем антибиотикам. Вакцинный штамм № 703 был чувствительным к гентамицину и ампициллину с МПК 5 мкг/мл и устойчивым к эритромицину и цефтриаксону. Свежeweделенный штамм № 162 проявлял

чувствительность к гентамицину с МПК 1 мкг/мл, а к эритромицину и ампициллину — с МПК 5 мкг/мл. Свежeweделенный штамм № 178 был чувствителен к гентамицину, эритромицину и ампициллину с МПК 5 мкг/мл. К цефтриаксону штаммы № 162 и № 178 были устойчивы и формировали био пленки различной интенсивности — от умеренных до плотных — при всех использованных концентрациях антибиотика. Свежeweделенный штамм № 211 был чувствительным только к эритромицину с МПК 5 мкг/мл и проявлял устойчивость к гентамицину, цефтриаксону и ампициллину.

Обсуждение

Нами исследована чувствительность био пленок основных сероваров вакцинных и свежeweделенных штаммов коклюшного микроба к различным антибиотикам. В результате проведенных исследований были разработаны оптимальные условия оценки чувствительности био пленочных форм *B. pertussis* к антибиотикам разных групп. Интенсивность образования био пленок штаммами зависела от стартовой посевной дозы микробных клеток и концентрации антибиотиков. В качестве оптимальной посевной дозы микробных клеток была выбрана доза 5 МОЕ/мл, при использовании которой большинство штаммов формировали плотные био пленки при отсутствии в питательной среде антибиотиков.

Выявлены определенные различия между био пленками исследованных штаммов по чувствительности к антибиотикам. Наиболее высокой устойчивостью к антибиотикам отличались вакцинный штамм № 305 и свежeweделенный штамм № 211, проявлявшие чувствительность только к эритромицину. Вакцинный штамм № 703 был чувствителен к гентамицину и ампициллину и проявлял резистентность к эритромицину и цефтриаксону. Вакцинный штамм № 475 был чувствителен ко всем испытанным антибиотикам. Штамм Tohama 1 был резистентен к ампициллину и чувствителен к остальным антибиотикам. Свежeweделенные штаммы № 178 и № 162 были устойчивы к цефтриаксону и чувствительны к гентамицину, эритромицину и ампициллину. В доступной литературе имеются отдельные указания на возможность более высокой антибиотикорезистентности био пленок свежeweделенных штаммов коклюшного микроба по сравнению с вакцинными [8]. Полученные нами результаты указывают на отсутствие существенных различий между исследованными вакцинными и свежeweделенными штаммами по чувствительности к антибиотикам.

Полученные результаты указывают на гетерогенность исследованных нами вакцинных и свежeweделенных штаммов *B. pertussis* по чувствительности к антибиотикам. При этом высокая чувствительность штаммов к определенным антибиотикам сочеталась с резистентностью к антибиотикам дру-

Влияние антибиотиков на рост биопленок (ОП) разных штаммов *B. pertussis* при посевной дозе 5 МОЕ ($M \pm m$)
 Effect of antibiotics on the growth of biofilms (OD values) of different of *B. pertussis* strains at a seeding dose of 5 IOU ($M \pm m$)

Доза антибиотика Dose of antibiotic	Штаммы <i>B. pertussis</i> / Strains of <i>B. pertussis</i>						
	вакцинные / vaccine				свежевыделенные / freshly isolated		
	Tohama 1	475	305	703	162	211	178
Контроль Control	Умеренная Moderate 0,097 ± 0,015	Плотная Dense 0,337 ± 0,96	Плотная Dense 0,248 ± 0,013	Умеренная Moderate 0,120 ± 0,010	Плотная Dense 0,257 ± 0,064	Плотная Dense 0,345 ± 0,082	Плотная Dense 0,222 ± 0,011
Гентамицин / Gentamicin							
5 мкг/мл 5 µg/ml	Нет No 0,096 ± 0,003	Нет No 0,064 ± 0,002	Слабая Weak 0,108 ± 0,004	Нет No 0,074 ± 0,005	Нет No 0,067 ± 0,001	Умеренная Moderate 0,112 ± 0,002	Нет No 0,095 ± 0,007
1 мкг/мл 1 µg/ml	Умеренная Moderate 0,173 ± 0,008	Нет No 0,073 ± 0,005	Умеренная Moderate 0,172 ± 0,026	Умеренная Moderate 0,116 ± 0,009	Нет No 0,078 ± 0,004	Умеренная Moderate 0,140 ± 0,015	Умеренная Moderate 0,120 ± 0,012
0,2 мкг/мл 0.2 µg/ml	Плотная Dense 0,224 ± 0,020	Нет No 0,086 ± 0,003	Умеренная Moderate 0,180 ± 0,021	Умеренная Moderate 0,151 ± 0,003	Умеренная Moderate 0,112 ± 0,016	Умеренная Moderate 0,147 ± 0,017	Умеренная Moderate 0,131 ± 0,013
Эритромицин / Erythromycin							
5 мкг/мл 5 µg/ml	Нет No 0,058 ± 0,006	Нет No 0,095 ± 0,004	Нет No 0,091 ± 0,003	Слабая Weak 0,100 ± 0,010	Нет No 0,071 ± 0,005	Нет No 0,057 ± 0,004	Нет No 0,081 ± 0,002
1 мкг/мл 1 µg/ml	Умеренная Moderate 0,117 ± 0,006	Умеренная Moderate 0,134 ± 0,007	Плотная Dense 0,216 ± 0,011	Слабая Weak 0,100 ± 0,004	Умеренная Moderate 0,154 ± 0,011	Умеренная Moderate 0,162 ± 0,005	Умеренная Moderate 0,174 ± 0,022
0,2 мкг/мл 0.2 µg/ml	Умеренная Moderate 0,152 ± 0,003	Умеренная Moderate 0,135 ± 0,003	Плотная Dense 0,256 ± 0,031	Умеренная Moderate 0,180 ± 0,009	Умеренная Moderate 0,175 ± 0,011	Умеренная Moderate 0,130 ± 0,010	Умеренная Moderate 0,144 ± 0,009
Цефтриаксон / Ceftriaxone							
5 мкг/мл 5 µg/ml	Нет No 0,089 ± 0,012	Нет No 0,081 ± 0,012	Умеренная Moderate 0,154 ± 0,012	Слабая Weak 0,101 ± 0,008	Умеренная Moderate 0,112 ± 0,002	Слабая Weak 0,101 ± 0,009	Умеренная Moderate 0,124 ± 0,014
1 мкг/мл 1 µg/ml	Нет No 0,096 ± 0,026	Умеренная Moderate 0,158 ± 0,025	Умеренная Moderate 0,154 ± 0,012	Умеренная Moderate 0,154 ± 0,023	Плотная Dense 0,189 ± 0,025	Умеренная Moderate 0,127 ± 0,014	Умеренная Moderate 0,132 ± 0,002
0,2 мкг/мл 0.2 µg/ml	Умеренная Moderate 0,159 ± 0,026	Умеренная Moderate 0,171 ± 0,029	Умеренная Moderate 0,171 ± 0,027	Плотная Dense 0,214 ± 0,018	Плотная Dense 0,240 ± 0,041	Умеренная Moderate 0,126 ± 0,020	Умеренная Moderate 0,150 ± 0,010
Ампициллин / Ampicillin							
5 мкг/мл 5 µg/ml	Слабая Weak 0,100 ± 0,007	Нет No 0,051 ± 0,001	Умеренная Moderate 0,112 ± 0,026	Нет No 0,055 ± 0,003	Нет No 0,056 ± 0,003	Умеренная Moderate 0,184 ± 0,060	Нет No 0,065 ± 0,002
1 мкг/мл 1 µg/ml	Умеренная Moderate 0,112 ± 0,004	Умеренная Moderate 0,185 ± 0,020	Умеренная Moderate 0,162 ± 0,009	Плотная Dense 0,202 ± 0,028	Умеренная Moderate 0,151 ± 0,049	Умеренная Moderate 0,170 ± 0,039	Умеренная Moderate 0,133 ± 0,017
0,2 мкг/мл 0.2 µg/ml	Умеренная Moderate 0,180 ± 0,021	Плотная Dense 0,219 ± 0,028	Плотная Dense 0,219 ± 0,023	Плотная Dense 0,228 ± 0,015	Плотная Dense 0,197 ± 0,039	Умеренная Moderate 0,187 ± 0,056	Умеренная Moderate 0,126 ± 0,026

Примечание. Различия между значениями ОП культур с отсутствием, слабыми, умеренными и плотными биопленками статистически достоверны ($p < 0,001$).

Note. Differences between the OD values for cultures with no, weak, moderate and dense biofilms are statistically significant ($p < 0.001$).

гих групп. Необходимо отметить высокие МПК антибиотиков для биопленок. МПК гентамицина составляла 0,2 мкг/мл для штамма № 475, 1 мкг/мл для штамма № 162 и 5 мкг/мл для штаммов Tohama 1, № 703 и № 178. МПК эритромицина и ампициллина составляли 5 мкг/мл для всех чувстви-

тельных к этим антибиотикам штаммов. МПК цефтриаксона для штаммов Tohama 1 и № 475 составляли 1 и 5 мкг/мл соответственно. В целом МПК использованных антибиотиков составляли от 0,2 до 5 мкг/мл. По данным литературы, МПК для планктонных культур коклюшного

микроба, определенные традиционными методами, составляют: эритромицин — 0,1–0,125 мкг/мл, ампициллин — 0,12–0,5 мкг/мл, гентамицин — 0,06–0,5 мкг/мл, цефтриаксон — 0,19 мкг/мл [11, 12]. Таким образом, биопленочные культуры *B. pertussis* отличаются более высокой устойчивостью к антибиотикам по сравнению с планктонными культурами.

Результаты проведенных исследований позволяют также сделать определенные выводы об эффективности исследованных антибиотиков по отношению к биопленочным культурам. Наибольшую активность проявлял эритромицин, подавлявший рост биопленок большинства исследованных штаммов. Только вакцинный штамм № 703 проявлял устойчивость к этому препарату. Эти результаты согласуются с данными других авторов о том, что эритромицин проявляет наиболее высокую активность *in vitro* по отношению к возбудителю коклюша [11, 13, 14]. К гентамицину были чувствительны 5 штаммов, а к ампициллину — 4 штамма. Наименее эффективным был цефтриаксон, подавлявший рост биопленок только 2 штаммов.

Механизмы повышенной устойчивости биопленок *B. pertussis* к антибиотикам до конца не изучены и могут быть связаны с рядом факторов, среди которых можно отметить особенности строения матрикса [5]. Полученные нами результаты указывают на целесообразность дальнейшего исследования чувствительности биопленок *B. pertussis* к антибиотикам и выяснения механизмов их высокой антибиотикорезистентности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kapil P., Merkel T.J. Pertussis vaccines and protective immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 2019; 59: 72–8. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2019.03.006>
2. Barkoff A.M., He Q. Molecular epidemiology of *Bordetella pertussis*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019; 1183: 19–33. https://doi.org/10.1007/5584_2019_402
3. Борисова О.Ю., Гадуа Н.Т., Пименова А.С., Петрова М.С., Попова О.П., Алешкин В.А. и др. Структура популяции штаммов возбудителя коклюша на территории России. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2016; 15(4): 22–8.
4. Kilgore P.E., Salim A.M., Zervos M.J., Schmitt H.J. Pertussis: microbiology, disease, treatment, and prevention. *Clin. Microbiol. Rev.* 2016; 29(3): 449–86. <https://doi.org/10.1128/CMR.00083-15>
5. Cattelan N., Dubey P., Arnal L., Yantorno O.M., Deora R. *Bordetella* biofilms: a lifestyle leading to persistent infections. *Pathog. Dis.* 2016; 74(1): ftv108. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv108>
6. Dorji D., Ross M.G., Singh A.K., Ramsay J.P., Price P., Lee S. Immunogenicity and protective potential of *Bordetella pertussis* biofilm and its associated antigens in a murine model. *Cell Immunol.* 2019; 337: 42–7. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2019.01.006>
7. Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2011; 88(3): 99–109.

8. Dorji D., Graham R.M., Richmond P., Keil A., Mukkur T.K. Biofilm forming potential and antimicrobial susceptibility of newly emerged Western Australian *Bordetella pertussis* clinical isolates. *Biofouling.* 2016; 32(9): 1141–52. <https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1232715>
9. Зайцев Е.М., Брицина М.В., Озерецковская М.Н., Мерцалова Н.У., Бажанова И.Г. Образование биопленок свежeweделенными и вакцинными штаммами *Bordetella pertussis* разных сероваров. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2019; 96(5): 47–50. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-5-47-50>
10. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. *Статистические методы в микробиологических исследованиях.* Ленинград; 1962.
11. Борисова О.Ю., Алешкин А.В., Ивашишникова Г.А., Донских Е.Е., Постникова Е.А., Алешкин В.А. Чувствительность штаммов *Bordetella pertussis* к антибактериальным препаратам. *Детские инфекции.* 2013; 12(2): 46–50.
12. Lonnqvist E., Barkoff A.M., Mertsola J. Antimicrobial susceptibility testing of Finnish *Bordetella pertussis* isolates collected during 2006–2017. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2018; 14: 12–6. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.02.012>
13. Hua C.Z., Wang H.J., Zhang Z., Tao X.F., Li J.P., Mi Y.M., et al. *In vitro* activity and clinical efficacy of macrolides, cefeprozone-sulbactam and piperacillin/piperacillin-tazobactam against *Bordetella pertussis* and the clinical manifestations in pertussis patients due to these isolates: A single-centre study in Zhejiang Province, China. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2019; 18: 47–51. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.01.029>
14. Jakubů V., Zavadilová J., Fabiánová K., Urbášková P. Minimum inhibitory concentrations of erythromycin and other antibiotics for Czech strains of *Bordetella pertussis*. *Epidemiol. Mikrobiol. Immunol.* 2015; 64(1): 12–5.

REFERENCES

1. Kapil P., Merkel T.J. Pertussis vaccines and protective immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 2019; 59: 72–8. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2019.03.006>
2. Barkoff A.M., He Q. Molecular epidemiology of *Bordetella pertussis*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019; 1183: 19–33. https://doi.org/10.1007/5584_2019_402
3. Borisova O.Yu., Gadua N.T., Pimenova A.S., Petrova M.S., Popova O.P., Aleshkin V.A., et al. Structure of population of strains of the *Bordetella pertussis* in the Russia. *Epidemiologiya i vaksinosprofilaktika.* 2016; 15(4): 22–8. (in Russian)
4. Kilgore P.E., Salim A.M., Zervos M.J., Schmitt H.J. Pertussis: microbiology, disease, treatment, and prevention. *Clin. Microbiol. Rev.* 2016; 29(3): 449–86. <https://doi.org/10.1128/CMR.00083-15>
5. Cattelan N., Dubey P., Arnal L., Yantorno O.M., Deora R. *Bordetella* biofilms: a lifestyle leading to persistent infections. *Pathog. Dis.* 2016; 74(1): ftv108. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv108>
6. Dorji D., Ross M.G., Singh A.K., Ramsay J.P., Price P., Lee S. Immunogenicity and protective potential of *Bordetella pertussis* biofilm and its associated antigens in a murine model. *Cell Immunol.* 2019; 337: 42–7. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2019.01.006>
7. Romanova Yu.M., Gintsburg A.L. Bacterial biofilms as a natural form of existence of bacteria in the environment and host organism. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2011; 88(3): 99–109. (in Russian)
8. Dorji D., Graham R.M., Richmond P., Keil A., Mukkur T.K. Biofilm forming potential and antimicrobial susceptibility of newly emerged Western Australian *Bordetella pertussis* clinical isolates. *Biofouling.* 2016; 32(9): 1141–52. <https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1232715>
9. Zaytsev E.M., Britsina M.V., Ozeretskovskaya M.N., Mertsalova N.U., Bazhanova I.G. The biofilm formation of freshly

- isolated and vaccine strains of *Bordetella pertussis* of different serotypes. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2019; 96(5): 47–50.
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-5-47-50> (in Russian)
10. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. *Statistical Methods in Microbiological Research [Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyakh]*. Leningrad; 1962. (in Russian)
 11. Borisova O.Yu., Aleshkin A.V., Ivashinnikova G.A., Donskikh E.E., Postnikova E.A., Aleshkin V.A. Susceptibility of *Bordetella pertussis* strains to antibacterial preparations. *Det-skie infektsii*. 2013; 12(2): 46–50. (in Russian)
 12. Lonnqvist E., Barkoff A.M., Mertsola J. Antimicrobial susceptibility testing of Finnish *Bordetella pertussis* isolates collected during 2006–2017. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2018; 14: 12–6. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.02.012>
 13. Hua C.Z., Wang H.J., Zhang Z., Tao X.F., Li J.P., Mi Y.M., et al. *In vitro* activity and clinical efficacy of macrolides, cefoperazone-sulbactam and piperacillin/piperacillin-tazobactam against *Bordetella pertussis* and the clinical manifestations in pertussis patients due to these isolates: A single-centre study in Zhejiang Province, China. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2019; 18: 47–51. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.01.029>
 14. Jakubů V., Zavadilová J., Fabiánová K., Urbášková P. Minimum inhibitory concentrations of erythromycin and other antibiotics for Czech strains of *Bordetella pertussis*. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* 2015; 64(1): 12–5.

Информация об авторах

Зайцев Евгений Михайлович[✉] — д.м.н., зав. лаб. иммуномодуляторов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия.
 ORCID ID: <http://www.orcid.org/0000-0002-4813-9074>.
 E-mail: pertussis@yandex.ru

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

Озеретковская Мария Николаевна — к.м.н., в.н.с. лаб. иммуномодуляторов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия.
 ORCID ID: <http://www.orcid.org/0000-0001-9809-4217>.

Мерцалова Наталья Устиновна — к.б.н., в.н.с. лаб. иммуномодуляторов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия.
 ORCID ID: <http://www.orcid.org/0000-0002-9072-2538>.

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

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Information about the authors

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

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

Maria N. Ozeretkovskaya — PhD (Med.), leading researcher, Laboratory of immunomodulators, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia.
 ORCID ID: <http://www.orcid.org/0000-0001-9809-4217>.

Natalia U. Mertsalova — PhD (Biol.), leading researcher, Laboratory of immunomodulators, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia.
 ORCID ID: <http://www.orcid.org/0000-0002-9072-2538>.

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

Contribution: the authors contributed equally to this article.



Эпидемиология и молекулярно-генетическая характеристика возбудителей Лайм-боррелиоза, циркулирующих в популяции клещей на территории Алматинской области Республики Казахстан

Бисенбай А.О.[✉], Жигайлов А.В., Перфильева Ю.В., Найзабаева Д.А., Неупокоева А.С., Бердыгулова Ж.А., Остапчук Е.О., Мальцева Э.Р., Куатбекова С.А., Низкородова А.С., Дмитровский А.М., Скиба Ю.А., Мамадалиев С.М.

Филиал Республиканского государственного предприятия «Национальный центр биотехнологии» в г. Алматы — Центральная референтная лаборатория, 050054, Алматы, Республика Казахстан

Введение. Информация о географическом распространении различных видов комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*B. burgdorferi s.l.*) имеет важное эпидемиологическое значение, поскольку различные геновиды связаны с определенными клиническими проявлениями Лайм-боррелиоза. Алматинская область Республики Казахстан считается эндемичной по клещевому боррелиозу, однако точная информация об уровне зараженности боррелиями клещей, обитающих в области, включая информацию о генотипах циркулирующих боррелий, отсутствует.

Целью данной работы было исследование клещей, снятых с людей в Алматинской области Республики Казахстан в 2018 г.

Материалы и методы. Клещей ($n = 253$) изучали на содержание в них ДНК *B. burgdorferi s.l.*, генотипирование выявленных боррелий по участку гена 16S рРНК осуществляли методом секвенирования. Проведен анализ эпидемиологических данных по заболеваемости Лайм-боррелиозом в Алматинской области за 2013–2018 гг.

Результаты. Превалирующими видами клещей, снятых с людей, оказались *Rhipicephalus turanicus* ($n = 116$), *Haemaphysalis punctata* ($n = 74$), *Dermacentor marginatus* ($n = 28$) и *Ixodes persulcatus* ($n = 23$). Уровень зараженности клещей *I. persulcatus* бактериями *B. burgdorferi s.l.* составил 39,13% ($n = 9$). ДНК *B. burgdorferi s.l.* также была детектирована в единичных особях *D. marginatus*, *H. punctata* и *R. turanicus*, хотя данные виды не являются компетентными векторами *B. burgdorferi s.l.* В результате секвенирования положительных гомогенатов клещей были идентифицированы два генотипа *B. burgdorferi s.l.*: *B. afzelii* и *B. garinii* и/или *B. bavariensis*.

Выводы. На территории Алматинской области циркулируют по меньшей мере два геновида: *B. afzelii* и *B. garinii* и/или *B. bavariensis*.

Ключевые слова: Лайм-боррелиоз; *Borrelia burgdorferi s.l.*; геновиды; ген 16S рРНК; 16S секвенирование.

Источник финансирования. Работа проводилась в рамках научного проекта № AP05132856 «Идентификация и молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Borrelia* sp., распространенных в различных регионах Казахстана, для усовершенствования системы эпидемиологического надзора за клещевым боррелиозом» Комитета по науке Министерства образования и науки Казахстана.

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

Для цитирования: Бисенбай А.О., Жигайлов А.В., Перфильева Ю.В., Найзабаева Д.А., Неупокоева А.С., Бердыгулова Ж.А., Остапчук Е.О., Мальцева Э.Р., Куатбекова С.А., Низкородова А.С., Дмитровский А.М., Скиба Ю.А., Мамадалиев С.М. Эпидемиология и молекулярно-генетическая характеристика возбудителей Лайм-боррелиоза, циркулирующих в популяции клещей на территории Алматинской области Республики Казахстан. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(6): 535–545.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-6-4>

Поступила 05.08.2020
Принята в печать 26.10.2020

Epidemiology and molecular genetic characteristics of Lyme borreliosis pathogens circulating in tick's population in the Almaty oblast of the Republic of Kazakhstan

Akerke O. Bissenbay[✉], Andrey V. Zhigailov, Yuliya V. Perfilyeva, Dinara A. Naizabayeva, Alena S. Neupokoyeva, Zhanna A. Berdygulova, Yekaterina O. Ostapchuk, Elina R. Maltseva,

Saltanat A. Kuatbekova, Anna S. Nizkorodova, Andrey M. Dmitrovskiy, Yuriy A. Skiba, Seydigapbar M. Mamadaliyev

Almaty Branch of Republican State Enterprise «National Center for Biotechnology» — Central Reference Laboratory, 050054, Almaty, Kazakhstan

Background. Information on the geographical distribution of different species of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* s.l.) complex is of great epidemiological importance, since different genospecies are associated with certain clinical manifestations of Lyme borreliosis. Although Almaty region of the Republic of Kazakhstan is considered to be endemic for tick-borne borreliosis, there is still no accurate data on the level of borrelia infection in ticks in the region, including information on the genotypes of circulating borrelia.

The aim of this work was to study ticks collected from humans in the Almaty region of the Republic of Kazakhstan in 2018.

Materials and methods. Ticks were tested for the presence of *B. burgdorferi* s.l. DNA, genotyping of the identified borrelia was done by sequencing of the fragment of 16S rRNA gene. The analysis of epidemiological data on the incidence of Lyme borreliosis in the Almaty region in 2013–2018 was performed.

Results. *Rhipicephalus turanicus* (116/253), *Haemaphysalis punctata* (74/253), *Dermacentor marginatus* (28/253), and *Ixodes persulcatus* (23/253) were the predominant species of ticks taken from humans. The prevalence of *B. burgdorferi* s.l. infection in *I. persulcatus* ticks was 39.13% (9/23). It should be noted that the DNA of *B. burgdorferi* s.l. was also detected in single individuals of *D. marginatus*, *H. punctata*, and *R. turanicus*, although these species are not considered as competent *B. burgdorferi* s.l. vectors.

Conclusion. As a result of sequencing of the positive homogenates of ticks, two genotypes of *B. burgdorferi* s.l. were identified: *B. afzelii* and *B. garinii* and/or *B. bavariensis*. Thus, at least two genospecies, *B. afzelii* and *B. garinii* and/or *B. bavariensis*, circulate in the territory of the Almaty region.

Keywords: Lyme borreliosis; *Borrelia burgdorferi* s.l.; genospecies; 16S rRNA gene; 16S sequencing.

Acknowledgments. The work was carried out within the framework of the scientific project No. AP05132856 «Identification and molecular genetic characterization of *Borrelia* sp. strains widespread in various regions of Kazakhstan to improve the epidemiological surveillance system for tick-borne borreliosis» by the Science Committee of the Ministry of Education and Science of Kazakhstan.

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

For citation: Bissenbay A.O., Zhigailov A.V., Perfilyeva Yu.V., Naizabayeva D.A., Neupokoyeva A.S., Berdygulova Zh.A., Ostapchuk E.O., Maltseva E.R., Kuatbekova S.A., Nizkorodova A.S., Dmitrovskiy A.M., Skiba Y.A., Mamadaliyev S.M. Epidemiology and molecular genetic characteristics of Lyme borreliosis pathogens circulating in tick's population in the Almaty oblast of the Republic of Kazakhstan. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(6): 535–545. (In Russ.).
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-6-4>

Received 5 August 2020
Accepted 26 October 2020

Введение

Боррелии — грамтрицательные спирохеты, относящиеся к порядку *Spirochaetales*, семейству *Spirochaetaceae*, роду *Borrelia*, являются облигатными внутриклеточными паразитами [1]. Представители *Borrelia* spp. сгруппированы в три основные филогенетические группы: группа Лайм-боррелиоза (ЛБ), формирующая надвидовой комплекс *B. burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* s.l.), группа боррелий клещевых возвратных лихорадок, в которую входят *B. miyamotoi*, *B. theileri* и *B. lonestari*, а также группа боррелий, связанных с рептилиями, включающая *B. turcica* [2–4].

К комплексу *B. burgdorferi* s.l. на сегодняшний день относят 22 геновида на основе общности генетических характеристик. По крайней мере 10 из них (*B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. bissettii*, *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. kurtenbachii*, *B. lusitanae*, *B. spielmanii* и *B. valaisiana* [5–7], *B. chilensis* [8]) являются патогенными для челове-

ка, и один геновид — *B. mayonii* — был недавно выделен из клинических образцов пациента, но его патогенность еще не была доказана экспериментально [9]. Каждый из патогенных геновидов тропен к определенным системам органов, хотя при этом может вызывать поражения любой локализации.

Заражение людей происходит при укусе иксодовых клещей, которые, в свою очередь, заражаются *B. burgdorferi* на любом этапе своего жизненного цикла, во время укуса естественных хозяев боррелий (мыши, полевки, бурундуки и другие мелкие млекопитающие, олени, а также некоторые виды птиц) [10]. Хотя возбудителей ЛБ периодически детектируют в клещах, относящихся к родам *Boophilus*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma* и *Rhipicephalus*, возможность выступать в качестве переносчиков заболевания доказана лишь для представителей рода *Ixodes* [11]. Основными векторами патогенов ЛБ в США и Канаде являются *I. scapularis* и *I. pacificus*, в Европе — *I. ricinus*, в Азии —

I. persulcatus [1, 11]. В Казахстане основным переносчиком боррелий является *I. persulcatus* [12–15]. На территории Казахстана встречаются и другие представители рода *Ixodes* (*I. kazakstani*, *I. pavlovskiy*, *I. laguri*, *I. crenulatus*, *I. redikorzevi*, *I. stromi*, *I. cornutus*, *I. subterraneus*, *I. lividus*, *I. apronophorus*, *I. eldaricus*) [14, 16], но их роль в качестве переносчиков ЛБ пока остается невыясненной [16].

Официальная регистрация ЛБ в Казахстане была начата в 2012 г. [12, 15]. Эндемичными по данному заболеванию считаются Алматинская и Восточно-Казахстанская области, на территории которых сосредоточены ареалы распространения *I. persulcatus*. Однако в последнее время единичные случаи данного заболевания стали регистрироваться в Акмолинской, Костанайской и Северо-Казахстанской областях [17]. Инфицированность клещей рода *Ixodes B. burgdorferi* s.l. в Восточно-Казахстанской области составляет около 40,9% [13], однако в Алматинской области данный показатель не определен. Геновиды надвидового комплекса *B. burgdorferi* s.l., циркулирующих в популяции клещей, обитающих на территории Алматинской области, не изучены.

Согласно классификации Кёппена–Гейгера, территория Алматинской области характеризуется влажным континентальным климатом, включающим 5 климатических зон: жаркий-летний влажный континентальный климат (Dfa), холодный полузасушливый климат (BSk), теплый-летний влажный континентальный климат (Dfb), средиземноморский жаркий-летний влажный континентальный климат (Dsa), холодный пустынный климат (BWk) [18]. Южный и восточный районы области расположены у подножия хребта северного Тянь-Шаня — Заилийского Алатау и Джунгарского Алатау. Предгорные и горные районы Алматинской области состоят из лиственных и смешанных лесов, типичных мест обитания *I. persulcatus* [19].

Характерные для ЛБ полиморфность клинической картины, сходность симптоматики с рядом других заболеваний, одновременное поражение нескольких органов и частая латентная персистенция возбудителя в организме могут приводить к ошибкам в диагностике заболевания, поздней постановке диагноза, несвоевременной медицинской помощи и, как следствие, к серьезным социально-экономическим потерям, связанным с временной нетрудоспособностью и инвалидизацией пациентов [13, 20, 21]. Известно, что геновиды *B. burgdorferi* s.l. связаны с различной патогенностью и клиническими проявлениями у пациентов. В связи с этим определение генотипов, циркулирующих в том или ином регионе, является важным для диагностики заболевания и может содействовать лучшему ведению пациентов с ЛБ [22].

В эпидемиологических исследованиях для детекции и генотипирования наиболее часто приме-

няются видоспецифичный ПЦР-анализ, полиморфизм длины рестрикционных фрагментов, анализ последовательности конкретных локусов генов [11]. В качестве мишеней при диагностике и генотипировании *B. burgdorferi* s.l. методами на основе ПЦР чаще всего используют гены рибосомной РНК (рРНК), такие как *flaB*, *recA*, *p66* и плазмидный ген *ospA* [11]. Наличие в гене *16S* рРНК как высококонсервативных, так и гипервариабельных участков позволяет, помимо выявления ДНК *B. burgdorferi* s.l., осуществлять типирование боррелий для выявления геновидов, а также проводить филогенетический анализ различных генотипов этих бактерий [23, 24].

Практика изучения зараженности клещей в эндемичных районах основывается на методах активного и пассивного мониторинга, а также эпидемиологического надзора за случаями ЛБ. При этом пассивный мониторинг дает возможность проанализировать не только уровень распространенности клещей в отдельных районах и степень зараженности их патогенами, но и риск заражения людей [25], а также успешно предсказать появление случаев заболевания людей и своевременно выявить новые зоны распространения ЛБ [26].

Поскольку в Алматинской области ежегодно увеличивается количество атак клещей и случаев лихорадки неясной этиологии [27], выявление уровня зараженности клещей *B. burgdorferi* s.l. и их генотипов крайне необходимо для разработки эффективных мер профилактики заболеваемости ЛБ. Понимание возможной дифференциальной патогенности между боррелиями разных генотипов важно для изучения этиологии заболевания и улучшения лабораторной диагностики.

Целью настоящего исследования был пассивный мониторинг распространенности и степени зараженности клещей разных видов *B. burgdorferi* s.l. и их генотипирование по гену *16S* рРНК для определения генотипов, циркулирующих в популяции клещей, а также анализ эпидемиологических данных по заболеваемости ЛБ в Алматинской области за 2013–2018 гг.

Материалы и методы

Для анализа эпидемиологических данных по заболеваемости ЛБ в Алматинской области использовали материалы Научно-практического центра санитарно-эпидемиологической экспертизы и мониторинга (НПЦСЭЭиМ) Комитета охраны общественного здоровья Министерства здравоохранения Республики Казахстан за 2013–2018 гг. [27].

Также в исследовании использовали 253 клеща, снятых с людей, проживающих в Алматинской области, в период с марта по июль 2018 г. Клещи были предоставлены НПЦСЭЭиМ. Видовую идентификацию клещей проводили морфологически с

использованием лупы, бинокулярного микроскопа и таксономических ключей идентификатора «Кровососущие клещи Казахстана» [28]. После этого клещей замораживали в индивидуальных криобирках при -20°C .

Клещей гомогенизировали индивидуально с использованием герметичного гомогенизатора «Homogenizer Mixer Mill MM 400» («Retsch»). Для этого единичных клещей помещали в пробирки с тремя размольтыми боросиликатными шарами (5 мм в диаметре) и 600 мкл фосфатно-солевого буфера и проводили гомогенизацию в течение 3 мин при 30 Гц. Гомогенаты центрифугировали в течение 5 мин при 5000g и 4°C . Далее отбирали супернатанты, из которых выделяли нуклеиновые кислоты с использованием набора «АмплиСенс® РИБО-преп» («ИнтерЛабСервис») согласно инструкции производителя.

ДНК *B. burgdorferi* s.l. выявляли с использованием набора «АмплиСенс® TBEV, *B. burgdorferi* s.l., *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis*/*E. muris*-FL» («ИнтерЛабСервис») по методике производителя. Положительными считали образцы, значение Ct которых было меньше 38.

Для секвенирования ДНК *B. burgdorferi* s.l. сначала проводили амплификацию участка гена *16S* рРНК боррелий с использованием полимезы High-Fidelity («Thermo Fisher») в амплификаторе «Mastercycler X50h» («Eppendorf») с использованием праймеров 16S1A (5'-СТААСG-СТGGCAGTGCCTCTTAAGC)/16S1B (5'-AGCGT-CAGTCTTGACCCAGAAGTTC) [29]. Далее проводили электрофорез полученных нуклеиновых кислот в системе для электрофореза «BioRad» в 1,5% агарозном геле на $1\times$ трис-ацетатном буфере, содержащем 0,5 мг/мл бромистого этидия («Sigma-Aldrich»). Элюцию ДНК-фрагментов из агарозного геля проводили с использованием набора «QIAquick Gel Extraction Kit» («Qiagen») по методике производителя. Очищенные амплификаты секвенировали в обоих направлениях, используя праймеры для ПЦР, набор для секвенирования «BigDye® Terminator v3.1» («Applied Biosystems») и генетический анализатор «ABI 3500XL» («Applied Biosystems»). Полученные участки гена *16S* рРНК сравнивали с нуклеотидными последовательностями различных геновидов боррелий, взятыми из базы данных NCBI¹, и выравнивали с использованием алгоритма MUSCLE. Филогенетическое древо было создано методом максимального правдоподобия с использованием программного обеспечения «MEGA X»². Значения надежности в процентах на каждом внутреннем узле были определены в соответствии с анализом начальной загрузки с 1000 повторов.

Статистическую обработку результатов проводили с применением программы R. Для расчета 95% доверительных интервалов (95% ДИ) был использован метод Клоппера–Пирсона. Критерий Пирсона χ^2 использовался для определения статистически значимой разницы между ожидаемыми частотами. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Анализ эпидемиологических данных по заболеваемости ЛБ за 2013–2018 гг.

На данный момент в районах Казахстана, эндемичных по клещевым инфекциям, существует значительный пробел в мониторинге лиц, укушенных клещами. Клещи, принесенные укушенными пациентами, не проверяются на наличие возбудителя боррелиоза, не проводится комплексное серологическое обследование пациентов в динамике, что затрудняет своевременную диагностику заболеваний.

По данным НПЦСЭЭИМ, количество подтвержденных случаев ЛБ в Казахстане за 2013–2018 гг. варьирует от 7 до 21 случая в год, таким образом средний уровень заболеваемости составляет 0,04–0,12 на 100 тыс. человек в год (табл. 1) [27].

Что касается Алматинской области, то в 2017 г. было зарегистрировано 4 подтвержденных случая ЛБ (0,11 на 100 тыс. человек), а в 2018 г. — 7 случаев (0,19 на 100 тыс. человек). К сожалению, клещи, укусившие данных пациентов, не были включены в наше исследование.

Видовой состав клещей, нападавших на людей в Алматинской области

Клещи, снятые с пострадавших от укуса людей в Алматинской области в марте–июле 2018 г., были идентифицированы до вида. Основываясь на морфологической идентификации, все 253 клеща были отнесены к имаго. Из 253 клещей 23 (9,1%) принадлежали к основному переносчику ЛБ — *I. persulcatus* (95% ДИ 5,9–13,3%; рис. 1). Наиболее часто на людей в Алматинской области нападали клещи *R. turanicus* (116/253; 45,9%; 95% ДИ 39,5–52,2%), *Ha. punctata* (74/253; 29,3%; 95% ДИ 23,7–35,3%) и *D. marginatus* (28/253; 11,1%; 95% ДИ 7,5–15,6%). Наименьшее количество напавших на людей клещей были идентифицированы как *Hu. asiaticum* (7/253; 2,7%; 95% ДИ 1,1–5,6%) и *D. pictus* (5/253, 1,9%; 95% ДИ 0,6–4,5%; рис. 1).

Периоды активности у разных родов клещей отличаются. Период наибольшей активности основного переносчика возбудителей ЛБ *I. persulcatus* в Алматинской области был отмечен с апреля по июнь. Преобладающие по количеству укусов виды клещей (*R. turanicus*, *Ha. punctata* и *D. marginatus*) проявляли наибольшую активность в период с мая

¹ URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

² URL: <http://www.megasoftware.net>

Таблица 1. Мониторинг заболеваемости ЛБ в Республике Казахстан в 2013–2018 гг.
Table 1. Monitoring of the LB incidence in the Republic of Kazakhstan in 2013–2018

Показатель Index	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Количество подтвержденных случаев клещевого иксодового боррелиоза Number of confirmed cases of tick-borne borreliosis	21	17	7	12	12	19
Количество случаев на 100 тыс. человек (уровень заболеваемости) Number of cases per 100,000 population (incidence rate)	0,12	0,09	0,04	0,06	0,07	0,11

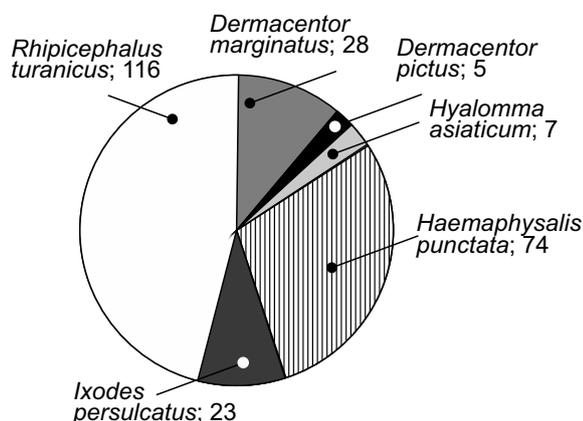


Рис. 1. Видовой состав клещей, снятых с людей в Алматинской области в марте–июле 2018 г.

Fig. 1. Species composition of ticks collected from people in Almaty region in the period from March to July 2018.

по июнь, с апреля по июнь и с апреля по май соответственно (рис. 2).

ПЦР-диагностика ДНК-препаратов клещей

В ходе анализа ДНК-препаратов клещей, снятых с людей в Алматинской области в 2018 г., методом ПЦР в режиме реального времени выявлено, что *I. persulcatus* являются наиболее инфицированными *B. burgdorferi* s.l. Однако ДНК *B. burgdorferi* s.l.

была детектирована также в клещах *D. marginatus*, *Ha. punctata* и *R. turanicus* (табл. 2). В любом случае уровень инфицированности клещей *I. persulcatus* боррелиями *B. burgdorferi* s.l. был достоверно выше, чем тот же показатель для *D. marginatus* ($\chi^2 = 7,9980$; $p = 0,001$), *Ha. punctata* ($\chi^2 = 23,154$; $p < 0,0001$) и *R. turanicus* ($\chi^2 = 21,986$; $p < 0,0001$). Уровни инфицированности *B. burgdorferi* s.l. клещей, не относящихся к роду *Ixodes*, не отличались достоверно друг от друга ($\chi^2 = 0,6832$; $p = 0,5$).

Следует также заметить, что относительное содержание *B. burgdorferi* s.l. в клещах *D. marginatus*, *Ha. punctata* и *R. turanicus* оказалось низким по сравнению со средним их содержанием в *I. persulcatus*, исходя из сравнительно высоких значений Ct (табл. 2).

Секвенирование и филогенетический анализ

Определение видовой принадлежности 16 qPCR-положительных образцов, выделенных из иксодовых клещей, осуществлялось посредством амплификации части гена *16S* рРНК размером 724 п.н. родоспецифичными праймерами с последующим секвенированием очищенных амплификатов. В качестве положительного контроля в ПЦР использовали геномную ДНК *B. garinii*. В 3 из 16 образцов не удалось получить амплификат, видимо, из-за низкого содержания в них ДНК *B. burgdorferi* s.l.

Таблица 2. Результаты ПЦР-анализа по детекции ДНК *B. burgdorferi* s.l. в клещах

Table 2. Results of PCR analysis for the detection of *B. burgdorferi* s.l. DNA in ticks

Вид клещей Tick species	Количество клещей, взятых для анализа Number of ticks tested	ПЦР-положительные PCR-positive	Уровень инфицированности клещей <i>B. burgdorferi</i> s.l., % Infection rate of ticks with <i>B. burgdorferi</i> s.l., %	ДИ 95% CI 95%	Ct
<i>I. persulcatus</i>	23	9	39,13	19,7–61,5	26,66 ± 1,59
<i>D. marginatus</i>	28	1	3,57	0,1–18,35	30,31
<i>D. pictus</i>	5	0	0,00	–	–
<i>Ha. punctata</i>	74	1	1,35	0,0–7,3	31,65
<i>Hy. asiaticum</i>	7	0	0,00	–	–
<i>R. turanicus</i>	116	5	4,31	1,4–9,8	35,18 ± 1,88
Всего Total	253	16	6,32		

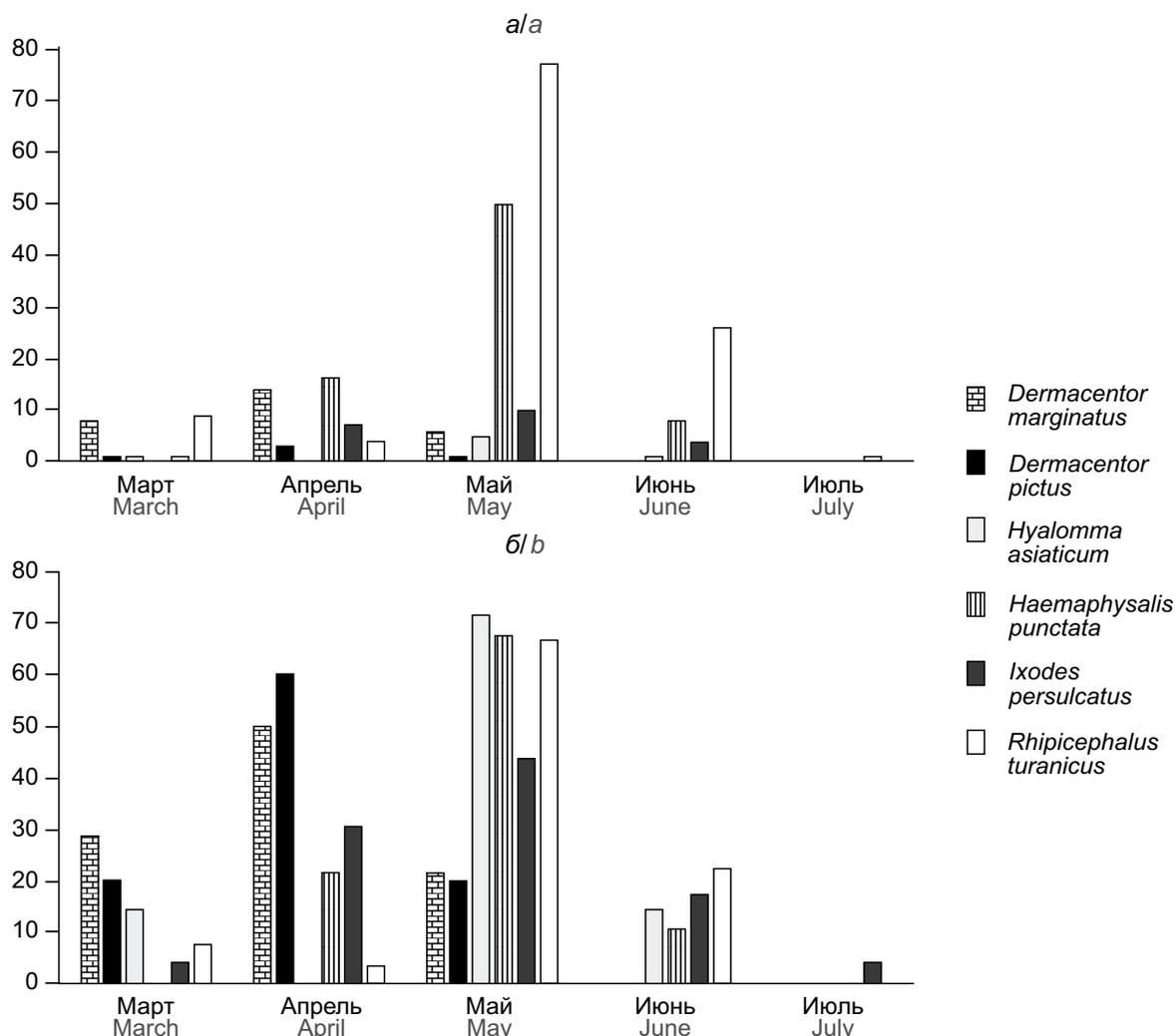


Рис. 2. Данные по клещам, снятым с людей в 2018 г. в Алматинской области.

a — общее число нападения клещей разных видов на людей по месяцам; *b* — процентное соотношение снятых с людей клещей по видам помесячно (общее число нападения клещей одного вида принято за 100%).

Fig. 2. Data on ticks collected from humans in 2018 in the Almaty region.

a — the total number of attacks by ticks of different species on people by months (the abscissa shows the months, the ordinate shows the number of tick bites); *b* — percentage of ticks collected from humans by species per month (the total number of attacks by ticks of one species is taken as 100%) (the abscissa shows the months; the ordinate shows the percentage of ticks collected from humans by species in each month).

На **рис. 3** представлены результаты электрофоретического анализа продуктов амплификации участка гена *16S* рРНК для 5 образцов, выделенных из *I. persulcatus*, для которых удалось получить считывание достаточного для анализа качества. Остальные 8 из 13 проанализированных методом секвенирования ДНК образцов давали миксы по нескольким позициям, что указывает на наличие в них ДНК от более чем одного геновида боррелий.

Согласно результатам проведенного филогенетического анализа, 4 образца (A003A1, A012A1, A041A1 и A196A1) были идентичны по последовательности амплификата линии VS461 (GenBank NR_104748.1) *B. afzelii* (**рис. 4**). Один образец (A186A1) содержал ДНК, наиболее близкую по последовательности амплифицированного участка ге-

на *16S* рРНК к линии PBi (GenBank NR_074854.1) *B. bavariensis* (2 нуклеотидные замены) и линии 20047 (GeneBank NR_043413.1) *B. garinii* (3 нуклеотидные замены) (**рис. 4**).

Обсуждение

В настоящей работе представлены анализ данных по подтвержденным случаям клещевого боррелиоза в Казахстане и данные видовой идентификации по видам клещей, нападавших на людей в Алматинской области Республики Казахстан с марта по июль 2018 г., уровня их инфицированности возбудителями ЛБ, а также генотипирования выявленных боррелий по участку гена *16S* рРНК.

Доминирующими видами клещей, нападающими на людей, были *R. turanicus*, *Ha. punctata*,

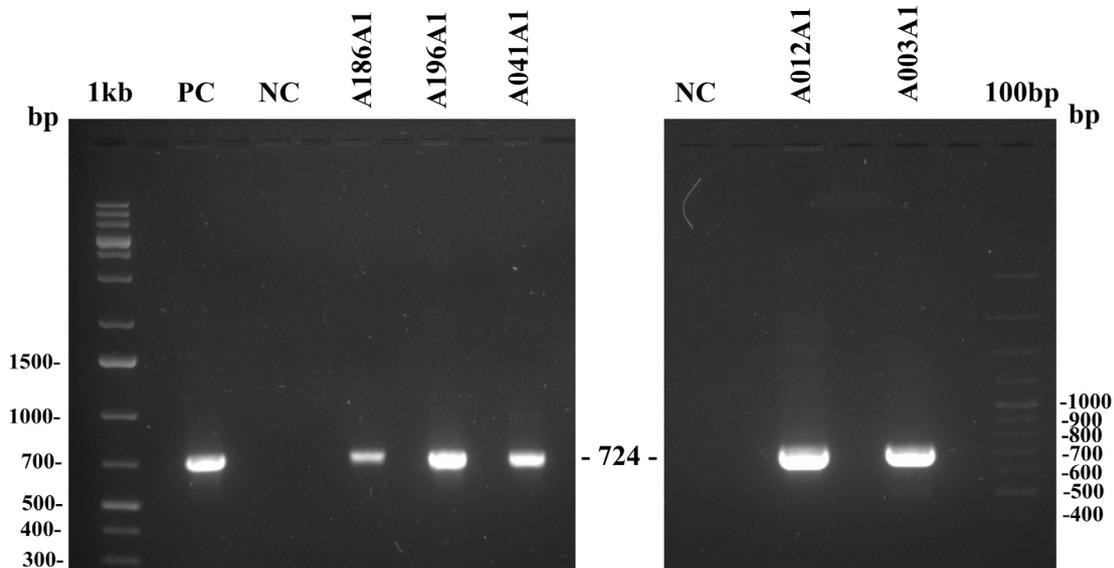


Рис. 3. Электрофоретический анализ продуктов амплификации участка гена *16S* рРНК *Borrelia* spp. с использованием праймеров 16S1A/16S1B.

1 kb — ДНК-маркер GeneRuler 1 kb, 100 bp — ДНК-маркер GeneRuler 100 bp plus; PC — *B. garinii* (положительный контроль); NC — негативный контроль. A003A1, A012A1, A041A1, A186A1, A196A1 — образцы ДНК, выделенные из одиночных клещей.

Fig. 3. Electrophoretic analysis of amplification products of the *16S* rRNA gene region of *Borrelia* spp. using primers 16S1A/16S1B.

1 kb — GeneRuler 1 kb DNA ladder; 100 bp — GeneRuler 100 bp plus DNA ladder; PC — *B. garinii* (positive control); NC — negative control. A003A1, A012A1, A041A1, A186A1, A196A1 — DNA samples, isolated from individual ticks.

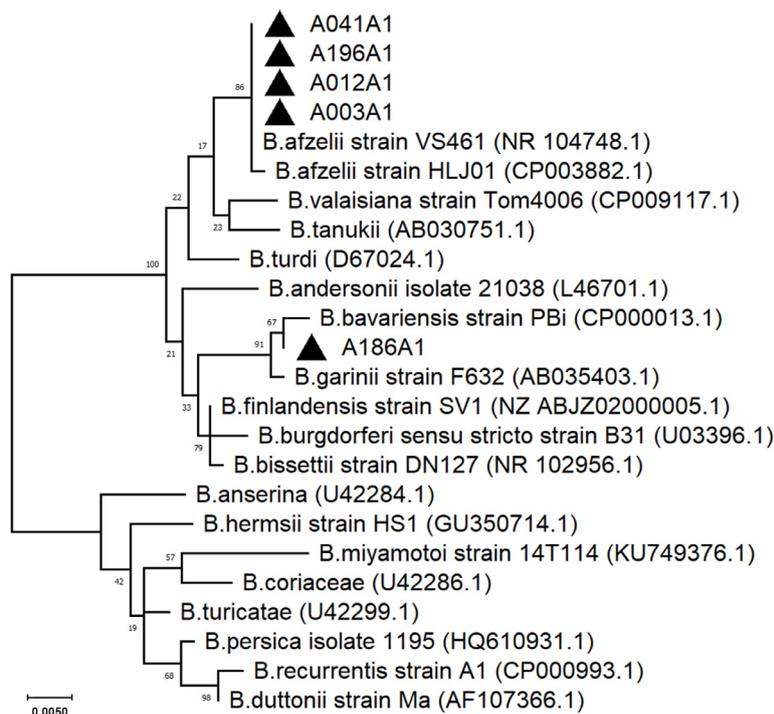


Рис. 4. Филогенетическое дерево *Borrelia* spp., обнаруженных в клещах *I. persulcatus*, на основе фрагмента гена *16S* рРНК.

Треугольниками отмечены образцы из настоящего исследования. Единица шкалы соответствует 0,005 нуклеотидной замене в пересчете на одну нуклеотидную позицию.

Fig. 4. Phylogenetic tree of *Borrelia* spp. detected in *I. persulcatus* ticks based on the *16S* rRNA gene fragment.

The triangles indicate the samples from the present study. The scale unit corresponds to 0.005 nucleotide substitution per one nucleotide position.

D. marginatus и *I. persulcatus*. Наиболее высокий уровень зараженности *B. burgdorferi* s.l. показали клещи *I. persulcatus*. Несмотря на то что этот показатель является сравнительно высоким, за 2018 г. в Алматинской области, в которой ареал распространения *I. persulcatus* перекрывается с наиболее густозаселенными районами, зарегистрировано лишь 7 официально подтвержденных случаев клещевого боррелиоза [27]. Возможно, это связано с отсутствием эффективной и своевременной системы диагностики данного заболевания в областных и городских клиниках в силу некоторых факторов: например, низкой информированности врачей о клинических проявлениях ЛБ, который характеризуется выраженным клиническим полиморфизмом течения заболевания; недостаточности/отсутствия в клиниках специфических методов лабораторной диагностики, а также варибельности результатов таких лабораторных методов на разных стадиях инфекции [20, 21]. Немаловажным является установление факта наличия укуса клеща, т.к. укус клещей зачастую бывает безболезненным и только около 50% пациентов с ЛБ указывают на факт присасывания клеща, что также усложняет процесс диагностики [13, 15].

Согласно результатам анализа ДНК-препаратов клещей, снятых с людей в Алматинской области, выявлено, что *I. persulcatus* являются наиболее инфицированными *B. burgdorferi* s.l. Однако следует отметить, что ДНК *B. burgdorferi* s.l. была детектирована также в клещах *D. marginatus*, *Ha. punctata* и *R. turanicus*, что было продемонстрировано ранее и другими исследовательскими группами. Так, например, F.K. Adham и соавт. показали, что в Египте агенты ЛБ были обнаружены в нескольких видах клещей: *Rhipicephalus*, *Hyalomma* и *Ornithodoros savignyi*, частично с высокой распространенностью — до 66% [30]. Дополнительно *Borrelia* spp. были обнаружены у клещей-олигофагов, таких как *I. frontalis*, *I. acuminatus* и *Argas reflexus*, а также у полифагов *Haemaphysalis* [11, 31]. Однако способность заражать людей *B. burgdorferi* s.l. для данных видов клещей не была доказана [31]. Таким образом, роль этих видов в энзоотических циклах агентов ЛБ остается неясной.

По результатам секвенирования в реальном времени ПЦР-положительных по *B. burgdorferi* s.l. образцов установлено, что в Алматинской области циркулируют по меньшей мере два геновида *B. burgdorferi* s.l. (*B. afzelii* и *B. garinii* и/или *B. bavariensis*). Однако полученные результаты требуют дополнительных исследований и подтверждений. Наше исследование было частично ограничено некоторыми факторами: отсутствием клинических данных от укушенных исследованными клещами людей, недостаточным количеством исследуемых образцов и объемом их выборки, отсутствием точных данных ГИС-координат по точкам, где были

зарегистрированы укусы клещей, лимитированностью в наличии коммерческих тест-систем для детекции *B. burgdorferi* s.l., а также материалов для таких современных методов генотипирования, как MLST/MLSA.

Данным исследованием мы хотим подчеркнуть факт зараженности и определенной распространенности патогенов ЛБ в популяции клещей Алматинской области Республики Казахстан. Более того, большая гетерогенность самих патогенов и их переносчиков все еще оставляет многие вопросы без ответа. Следовательно, для более точной картины распространенности и уровня зараженности клещей разных видов, в частности *I. persulcatus*, патогенами клещевого боррелиоза в дальнейшем необходимо продолжить исследования, охватывающие следующие области:

- комплексные эпидемиологические исследования, в том числе в регионах за пределами основных районов распространения *I. persulcatus*;
- обнаружение коинфекций с другими клещевыми патогенами и выявление биотических и абиотических факторов, которые влияют на распространение *Borrelia* spp.;
- ассоциации хозяина и вектора: спирохеты комплекса ЛБ могут быть обнаружены в неожиданно широком диапазоне возможных векторов, что указывает на необходимость изучения потенциала различных видов членистоногих в отношении передачи агентов ЛБ людям или резервуарам позвоночных;
- филогения и таксономия спирохет *Borrelia* spp.: для характеристики новых генотипов рекомендуется применение самых современных методов, таких как MLSA/MLST.

Благодарность

Авторы выражают признательность Л.С. Карань (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) за предоставление в качестве положительного контроля геномной ДНК *B. garinii*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Halperin J.J. *Lyme Disease: an Evidence-Based Approach*. Wallingford; 2018.
<https://doi.org/10.1079/9781786392077.0000>
2. Margos G., Vollmer S.A., Ogden N.H., Fish D. Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Infect. Genet. Evol.* 2011; 11(7): 1545–63.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.07.022>
3. Adam T., Gossman G.S., Rasiyah C., Göbel U.B. Phenotypic and genotypic analysis of *Borrelia burgdorferi* isolates from various sources. *Infect. Immunol.* 1991; 59(8): 2579–85.
<https://doi.org/10.1128/IAI.59.8.2579-2585.1991>
4. Baranton G., Marti R.N., Postic D. *Borrelia burgdorferi*, taxonomy, pathogenicity and spread. *Ann. Med. Interne (Paris)*. 1998; 149(7): 455–8. (in French)

5. Stanek G., Reiter M. The expanding Lyme *Borrelia* complex – clinical significance of genomic species? *Clin. Microbiol. Infect.* 2011; 17(4): 487–93. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03492.x>
6. Rudenko N., Golovchenko M., Grubhoffer L., Oliver J.H. Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks Tick Borne Dis.* 2011; 2(3): 123–8. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2011.04.002>
7. Margos G., Lane R.S., Fedorova N., Koloczek J., Piesman J., Hojgaard A., et al. *Borrelia bissettiae* sp. nov. and *Borrelia californiensis* sp. nov. prevail in diverse enzootic transmission cycles. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016; 66(3): 1447–52. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000897>
8. Ivanova L.B., Tomova A., González-Acuña D., Murúa R., Moreno C.X., Hernández C., et al. *Borrelia chilensis*, a new member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex that extends the range of this genospecies in the Southern Hemisphere. *Environ. Microbiol.* 2014; 16(4): 1069–80. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12310>
9. Pritt B.S., Respicio-Kingry L.B., Sloan L.M., Schriefer M.E., Replogle A.J., Bjork J., et al. *Borrelia mayonii* sp. nov., a member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, detected in patients and ticks in the upper midwestern United States. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016; 66(11): 4878–80. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001445>
10. Shapiro E.D. *Borrelia burgdorferi* (Lyme disease). *Pediatr. Rev.* 2014; 35(12): 500–9. <https://doi.org/10.1542/pir.35-12-500>
11. Franke J., Hildebrandt A., Dorn W. Exploring gaps in our knowledge on Lyme borreliosis spirochaetes — updates on complex heterogeneity, ecology, and pathogenicity. *Ticks Tick Borne Dis.* 2013; 4(1-2): 11–25. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.06.007>
12. Егембердиева Р.А., Ермуханова Н.Т., Дмитровский А.М., Шапиева Ж.Ж., Кыраубаев К.К., Лавренюк В.И. Эпидемиологическая характеристика некоторых клещевых трансмиссивных инфекций в Казахстане. *Национальные приоритеты России.* 2013; (2): 92–4.
13. Егембердиева Р.А., Токсанбаева К.Н., Дуйсенова А.К., Ермуханова Н.Т. Клинические проявления хронических форм клещевого боррелиоза в Восточно-Казахстанской области. *Вестник Казахского национального медицинского университета.* 2013; (2): 89–92.
14. Филиппова Н.А. Иксодовые клещи подсемейства *Ixodidae*. В кн.: Филиппова Н.А. *Фауна СССР. Паукообразные. Том IV, выпуск 4.* Ленинград: Наука; 1977.
15. Егембердиева Р.А. *Клинико-эпидемиологические проявления некоторых природно-очаговых трансмиссивных инфекций в Казахстане:* Дисс. д-ра мед. наук. Алматы; 2011.
16. Kovalev S.Y., Fedorova S.Zh., Mukhacheva T.A. Molecular features of *Ixodes kazakstani*: first results. *Ticks Tick Borne Dis.* 2018; 9(3): 759–61. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.02.019>
17. Курмангалиева К.Б., Атыгаева С.К., Жамбурчинова А.Н., Ширшикбаева Г.Е. Случай болезни Лайма в эндемичном регионе. *Журнал инфектологии.* 2014; 6(1): 93–4.
18. Rubel F., Brugger K., Walter M., Vogelgesang J.R., Didyk Y.M., Fu S., et al. Geographical distribution, climate adaptation and vector competence of the Eurasian hard tick *Haemaphysalis concinna*. *Ticks Tick Borne Dis.* 2018; 9(5): 1080–9. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.04.002>
19. Perfil'yeva Y.V., Shapiyeva Zh., Ostapchuk E.O., Berdygulova Zh., Bissenbay A.O., Kulemin M.V., et al. Tick-borne pathogens and their vectors in Kazakhstan — a review. *Ticks Tick Borne Dis.* 2020; 11(5): 101498. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101498>
20. Strle F., Stanek G. Clinical manifestations and diagnosis of Lyme borreliosis. *Curr. Probl. Dermatology.* 2009; 37: 51–110. <https://doi.org/10.1159/000213070>
21. Карпов И.А., Соловей Н.В., Анисько Л.А., Щерба В.В., Данилов Д.Е. Лайм-боррелиоз: вопросы диагностики и рациональной этиотропной терапии. *Клиническая инфектология и паразитология.* 2015; (3): 64–80.
22. Crowder C.D., Matthews H.E., Schutzer S., Rounds M.A., Luft B.J., Nolte O., et al. Genotypic variation and mixtures of Lyme *Borrelia* in Ixodes ticks from North America and Europe. *PLoS One.* 2010; 5(5): e10650. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010650>
23. Lee S.H., Vigliotti V.S., Vigliotti J.S., Jones W., Pappu S. Increased sensitivity and specificity of *Borrelia burgdorferi* 16S ribosomal DNA detection. *Am. J. Clin. Pathol.* 2010; 133(4): 569–76. <https://doi.org/10.1309/AJCPI72YAXRHYEE>
24. Greisen K., Loeffelholz M., Purohit A., Leong D. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32(2): 335–51. <https://doi.org/10.1128/JCM.32.2.335-351.1994>
25. Ogden N.H., Bouchard C., Kurtenbach K., Margos G., Lindsay L.R., Trudel L., et al. Active and passive surveillance and phylogenetic analysis of *Borrelia burgdorferi* elucidate the process of Lyme disease risk emergence in Canada. *Environ. Health Perspect.* 2010; 118(7): 909–14. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901766>
26. Ripoche M., Gasmi S., Adam-Poupard A., Koffi J.K., Lindsay L.R., Ludwig A., et al. Passive tick surveillance provides an accurate early signal of emerging Lyme disease risk and human cases in Southern Canada. *J. Med. Entomol.* 2018; 55(4): 1016–26. <https://doi.org/10.1093/jme/tjy030>
27. Бекшин Ж.М., Есмагамбетова А.С., Ахметов В.Н. *Санитарно-эпидемиологическая ситуация в Республике Казахстан за 2018 год.* Алматы; 2019: 111–8.
28. Галузо И.Г. *Кровососущие клещи Казахстана. Том I.* Алмата; 1946.
29. Richter D., Allgöwer R., Matuschka F.R. Co-feeding transmission and its contribution to the perpetuation of the Lyme disease spirochete *Borrelia afzelii*. *Emerg. Infect. Dis.* 2002; 8(12): 1421–5. <https://doi.org/10.3201/eid0812.010519>
30. Adham F.K., El-Samie-Abd E.M., Gabre R.M., El Hussein H. Detection of tick blood parasites in Egypt using PCR assay II — *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 2010. 40: 553–564.
31. Gern L., Humair P.F. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe. In: Gray J., Kahl O., Lane R.S., Stanek G., eds. *Lyme Borreliosis Biology, Epidemiology and Control.* New York: CABI Publishing; 2002: 149–74.

REFERENCES

1. Halperin J.J. *Lyme Disease: an Evidence-Based Approach.* Wallingford; 2018. <https://doi.org/10.1079/9781786392077.0000>
2. Margos G., Vollmer S.A., Ogden N.H., Fish D. Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Infect. Genet. Evol.* 2011; 11(7): 1545–63. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.07.022>
3. Adam T., Gossman G.S., Rasiyah C., Göbel U.B. Phenotypic and genotypic analysis of *Borrelia burgdorferi* isolates from various sources. *Infect. Immunol.* 1991; 59(8): 2579–85. <https://doi.org/10.1128/IAI.59.8.2579-2585.1991>
4. Baranton G., Marti R.N., Postic D. *Borrelia burgdorferi*, taxonomy, pathogenicity and spread. *Ann. Med. Interne (Paris).* 1998; 149(7): 455–8. (in French)
5. Stanek G., Reiter M. The expanding Lyme *Borrelia* complex – clinical significance of genomic species? *Clin. Microbiol. Infect.* 2011; 17(4): 487–93. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03492.x>
6. Rudenko N., Golovchenko M., Grubhoffer L., Oliver J.H. Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks Tick Borne Dis.* 2011; 2(3): 123–8. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2011.04.002>

7. Margos G., Lane R.S., Fedorova N., Koloczek J., Piesman J., Hojgaard A., et al. *Borrelia bissetiae* sp. nov. and *Borrelia californiensis* sp. nov. prevail in diverse enzootic transmission cycles. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016; 66(3): 1447–52. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000897>
8. Ivanova L.B., Tomova A., González-Acuña D., Murúa R., Moreno C.X., Hernández C., et al. *Borrelia chilensis*, a new member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex that extends the range of this genospecies in the Southern Hemisphere. *Environ. Microbiol.* 2014; 16(4): 1069–80. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12310>
9. Pritt B.S., Respicio-Kingry L.B., Sloan L.M., Schriefer M.E., Replogle A.J., Bjork J., et al. *Borrelia mayonii* sp. nov., a member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, detected in patients and ticks in the upper midwestern United States. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016; 66(11): 4878–80. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001445>
10. Shapiro E.D. *Borrelia burgdorferi* (Lyme disease). *Pediatr. Rev.* 2014; 35(12): 500–9. <https://doi.org/10.1542/pir.35-12-500>
11. Franke J., Hildebrandt A., Dorn W. Exploring gaps in our knowledge on Lyme borreliosis spirochaetes – updates on complex heterogeneity, ecology, and pathogenicity. *Ticks Tick Borne Dis.* 2013; 4(1–2): 11–25. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.06.007>
12. Egemberdieva R.A., Ermukhanova N.T., Dmitrovskiy A.M., Shapieva Zh.Zh., Kyraubaev K.K., Lavrenyuk V.I. Epidemiological characteristics of some tick-borne vector-borne infections in Kazakhstan. *Natsional'nye priority Rossii.* 2013; (2): 92–4. (in Russian)
13. Egemberdieva R.A., Toksanbaeva K.N., Duisenova A.K., Ermukhanova N.T. Clinical manifestations of chronic forms tick-borne borreliosis in the East Kazakhstan area. *Vestnik Kazakhskogo natsional'nogo meditsinskogo universiteta.* 2013; (2): 89–92. (in Russian)
14. Filippova N.A. Ixod mites of the subfamily Ixodidae. In: Filippova N.A. *Fauna of the USSR. Arachnida. Volume IV, Issue 4 [Fauna SSSR. Paukoobraznye. Tom IV, vypusk 4].* Leningrad: Nauka; 1977. (in Russian)
15. Egemberdieva R.A. *Clinical and epidemiological manifestations of some natural focal vector-borne infections in Kazakhstan:* Diss. Alma-Ata; 2011. (in Russian)
16. Kovalev S.Y., Fedorova S.Zh., Mukhacheva T.A. Molecular features of *Ixodes kazakstani*: first results. *Ticks Tick Borne Dis.* 2018; 9(3): 759–61. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.02.019>
17. Kurmangalieva K.B., Atygaeva S.K., Zhamburchinova A.N., Shirshikbaeva G.E. Case of Lyme disease in a non-endemic region. *Zhurnal infektologii.* 2014; 6(1): 93–4. (in Russian)
18. Rubel F., Brugger K., Walter M., Vogelgesang J.R., Didyk Y.M., Fu S., et al. Geographical distribution, climate adaptation and vector competence of the Eurasian hard tick *Haemaphysalis concinna*. *Ticks Tick Borne Dis.* 2018; 9(5): 1080–9. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.04.002>
19. Perfil'yeva Y.V., Shapiyeva Zh., Ostapchuk E.O., Berdygulova Zh., Bissenbay A.O., Kulemin M.V., et al. Tick-borne pathogens and their vectors in Kazakhstan — a review. *Ticks Tick Borne Dis.* 2020; 11(5): 101498. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101498>
20. Strle F., Stanek G. Clinical manifestations and diagnosis of Lyme borreliosis. *Curr. Probl. Dermatol.* 2009; 37: 51–110. <https://doi.org/10.1159/000213070>
21. Karpov I.A., Solovey N.V., Anis'ko L.A., Shcherba V.V., Danilov D.E. Lyme borreliosis: questions of diagnosis and rational antibacterial treatment. *Klinicheskaya infektologiya i parazitologiya.* 2015; (3): 64–80. (in Russian)
22. Crowder C.D., Matthews H.E., Schutzer S., Rounds M.A., Luft B.J., Nolte O., et al. Genotypic variation and mixtures of Lyme *Borrelia* in Ixodes ticks from North America and Europe. *PLoS One.* 2010; 5(5): e10650. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010650>
23. Lee S.H., Vigliotti V.S., Vigliotti J.S., Jones W., Pappu S. Increased sensitivity and specificity of *Borrelia burgdorferi* 16S ribosomal DNA detection. *Am. J. Clin. Pathol.* 2010; 133(4): 569–76. <https://doi.org/10.1309/AJCP172YAXRHYHEE>
24. Greisen K., Loeffelholz M., Purohit A., Leong D. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32(2): 335–51. <https://doi.org/10.1128/JCM.32.2.335-351.1994>
25. Ogden N.H., Bouchard C., Kurtenbach K., Margos G., Lindsay L.R., Trudel L., et al. Active and passive surveillance and phylogenetic analysis of *Borrelia burgdorferi* elucidate the process of Lyme disease risk emergence in Canada. *Environ. Health Perspect.* 2010; 118(7): 909–14. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901766>
26. Ripoché M., Gasmi S., Adam-Poupart A., Koffi J.K., Lindsay L.R., Ludwig A., et al. Passive tick surveillance provides an accurate early signal of emerging Lyme disease risk and human cases in Southern Canada. *J. Med. Entomol.* 2018; 55(4): 1016–26. <https://doi.org/10.1093/jme/tjy030>
27. Bekshin Zh.M., Esmagambetova A.S., Akhmetov V.N. *Sanitary and Epidemiological Situation in the Republic of Kazakhstan in 2018 [Sanitarno-epidemiologicheskaya situatsiya v Respublike Kazakhstan za 2018 god].* Almaty; 2019: 111–8. (in Russian)
28. Galuzh I.G. *Blood-Sucking Ticks of Kazakhstan. Volume 1 [Krovososushchie kleshchi Kazakhstana. Tom 1].* Alma-Ata; 1946. (in Russian)
29. Richter D., Allgöwer R., Matuschka F.R. Co-feeding transmission and its contribution to the perpetuation of the Lyme disease spirochete *Borrelia afzelii*. *Emerg. Infect. Dis.* 2002; 8(12): 1421–5. <https://doi.org/10.3201/eid0812.010519>
30. Adham F.K., El-Samie-Abd E.M., Gabre R.M., El Hussein H. Detection of tick blood parasites in Egypt using PCR assay II — *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 2010; 40: 553–564.
31. Gern L., Humair P.F. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe. In: Gray J., Kahl O., Lane R.S., Stanek G., eds. *Lyme Borreliosis Biology, Epidemiology and Control.* New York: CABI Publishing; 2002: 149–74.

Информация об авторах

Бисенбай Акерке Оңарбайқызы[✉] — н.с. отдела биобезопасности и биозащиты Филиала РГП НЦБ в г. Алматы, Алматы, Республика Казахстан.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7109-2534>.
E-mail: akerke.bissenbay@gmail.com

Жигаилов Андрей Викторович — к.б.н., в.н.с. лаб. молекулярной биологии Филиала РГП НЦБ в г. Алматы, Алматы, Республика Казахстан.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9646-033X>.

Перфильева Юлия Викторовна — к.б.н., в.н.с. лаб. экспертизы и диагностики Филиала РГП НЦБ в г. Алматы, Алматы, Республика Казахстан.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6803-0773>.

Information about the authors

Akerke O. Bissenbay[✉] — researcher, Department of biosafety and biosecurity, Almaty Branch of National Center for Biotechnology (NCB), Almaty, Kazakhstan.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7109-2534>.
E-mail: akerke.bissenbay@gmail.com

Andrey V. Zhigailov — PhD (Biol.), leading researcher, Laboratory of molecular biology, Almaty Branch of NCB, Almaty, Kazakhstan.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9646-033X>.

Yuliya V. Perfil'yeva — PhD (Biol.), leading researcher, Laboratory for expertise and diagnostics, Almaty Branch of NCB, Almaty, Kazakhstan.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6803-0773>.

Найзабаева Динара Адамжанкызы — м.н.с. лаб. экспертизы и диагностики Филиала РГП НЦБ в г. Алматы, Алматы, Республика Казахстан.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0606-4289>.

Неупокоева Алена Сергеевна — с.н.с. лаб. экспертизы и диагностики Филиала РГП НЦБ в г. Алматы, Алматы, Республика Казахстан.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7257-8037>.

Бердыгулова Жанна Амировна — н.с. лаб. молекулярной биологии Филиала РГП НЦБ в г. Алматы, Алматы, Республика Казахстан.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0379-2472>.

Остапчук Екатерина Олеговна — PhD, в.н.с. лаб. молекулярной биологии Филиала РГП НЦБ в г. Алматы, Алматы, Республика Казахстан.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3771-423X>.

Мальцева Элина Романовна — PhD, начальник отдела биобезопасности и биозащиты Филиала РГП НЦБ в г. Алматы, Алматы, Республика Казахстан.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9198-695X>.

Куатбекова Салтанат Алимбековна — м.н.с. лаб. экспертизы и диагностики Филиала РГП НЦБ в г. Алматы, Алматы, Республика Казахстан.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5569-1847>.

Низкородова Анна Сергеевна — к.б.н., в.н.с. лаб. молекулярной биологии Филиала РГП НЦБ в г. Алматы, Алматы, Республика Казахстан.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1597-7207>.

Дмитровский Андрей Михайлович — д.м.н., проф., зав. лаб. экспертизы и диагностики Филиала РГП НЦБ в г. Алматы, Алматы, Республика Казахстан.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4714-3079>.

Скиба Юрий Александрович — к.б.н., зам. директора Филиала РГП НЦБ в г. Алматы, Алматы, Республика Казахстан.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4895-1473>.

Мамадалиев Сейдигапбар Мамадалиевич — д.вет.н., проф., директор Филиала РГП НЦБ в г. Алматы, Алматы, Республика Казахстан.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7767-0251>.

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Dinara A. Naizabayeva — junior researcher, Laboratory for expertise and diagnostics, Almaty Branch of NCB, Almaty, Kazakhstan.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0606-4289>.

Alena S. Neupokoyeva — senior researcher, Laboratory for expertise and diagnostics, Almaty Branch of NCB, Almaty, Kazakhstan.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7257-8037>.

Zhanna A. Berdygulova — PhD, leading researcher, Laboratory of molecular biology, Almaty Branch of NCB, Almaty, Kazakhstan.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0379-2472>.

Yekaterina O. Ostapchuk — PhD, leading researcher, Laboratory of molecular biology, Almaty Branch of NCB, Almaty, Kazakhstan.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3771-423X>.

Elina R. Maltseva — PhD, Head, Biosafety and biosecurity department, Almaty Branch of NCB, Almaty, Kazakhstan.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9198-695X>.

Saltanat A. Kuatbekova — junior researcher, Laboratory for expertise and diagnostics, Almaty Branch of NCB, Almaty, Kazakhstan.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5569-1847>.

Anna S. Nizkorodova — PhD (Biol.), leading researcher, Laboratory of molecular biology, Almaty Branch of NCB, Almaty, Kazakhstan.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1597-7207>.

Andrey M. Dmitrovskiy — D. Sci. (Med.), Prof., Head, Laboratory for expertise and diagnostics, Almaty Branch of NCB, Almaty, Kazakhstan.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4714-3079>.

Yuriy A. Skiba — PhD (Biol.), Deputy director, Almaty Branch of NCB, Almaty, Kazakhstan.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4895-1473>.

Seydigapbar M. Mamadaliyev — D. Sci. (Vet.), Prof., Director, Almaty Branch of NCB, Almaty, Kazakhstan.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7767-0251>.

Contribution: the authors contributed equally to this article.



Анализ спорадических случаев инвазивного листериоза в мегаполисе

Воронина О.Л.^{1✉}, Тартаковский И.С.¹, Ющук Н.Д.², Рыжова Н.Н.¹, Аксёнова Е.И.¹, Кунда М.С.¹, Кутузова А.В.¹, Мелкумян А.Р.⁴, Карпова Т.И.¹, Груздева О.А.³, Климова Е.А.², Кареткина Г.Н.², Чемерис О.Ю.², Тарасова Т.А.¹, Дронина Ю.Е.¹, Орлова О.Е.⁵, Бурмистрова Е.Н.⁶, Цибин А.Н.⁷

¹ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Гамалеи Н.Ф.», 123098, Москва, Россия;

²ФГБУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова», 127473, Москва, Россия;

³ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова», 119992, Москва, Россия;

⁴ГБУЗ «Городская клиническая больница имени Ф.И. Иноземцева», 105187, Москва, Россия;

⁵ГБУЗ «Городская клиническая больница имени Л.А. Ворохобова», 123423, Москва, Россия;

⁶ГБУЗ «Городская клиническая больница имени С.С. Юдина», 115446, Москва, Россия;

⁷ГБУ «НИИ организации здравоохранения и медицинского менеджмента», 115008, Москва, Россия

Введение. Листериоз — пищевая инфекция, наиболее опасная для лиц из групп риска. Восприимчивость к листерийной инфекции определяется комплексом причин: факторами окружающей среды, иммунитетом человека, вирулентностью микроорганизма. Усиливать восприимчивость к листериозу могут и ранее перенесенные инфекции, особенно вирусные, количество выявленных возбудителей которых регулярно возрастает.

Целью исследования была молекулярно-генетическая характеристика возбудителей спорадического инвазивного листериоза в мегаполисе, выделенных преимущественно в период роста заболеваемости гриппом и ОРВИ.

Материалы и методы. Изоляты *Listeria monocytogenes* были выделены от 18 госпитализированных пациентов в стационарах Москвы с ноября 2018 г. по октябрь 2019 г. В первой группе сравнения были изоляты из продуктов питания, а также изолят из рыбных пресервов. Во вторую группу сравнения вошли изоляты из окружающей среды, исследованные ранее. Клинические изоляты исследовали методами мультилокусного секвенирования, включающими стандартную схему MLST, дополненную локусами генов интерналинов. Полногеномное секвенирование с последующим анализом корового генома (cgMLST) применяли для сравнения изолятов аутохтонного генотипа (ST7).

Результаты. В случаях инвазивного листериоза 44% изолятов относилось к перинатальному листериозу, 27% составили изоляты от пациентов с менингитом. *L. monocytogenes* филогенетической линии II преобладала в этих группах заболеваний, случаи которых пришлось на период превышения эпидемического порога по гриппу в сезоне 2018/2019 гг. Листериозная пневмония, выявленная в самой старшей возрастной группе, была приурочена к сезону осенних ОРВИ и преимущественно вызвана *L. monocytogenes* филогенетической линии I. Исследование геномов изолятов ST7 показало идентичность коровых геномов бактерий, выделенных в паре родильница–новорожденный. Из пищевых изолятов ST7 наиболее близким родственником клиническим был изолят из мяса (23 локуса отличий, общая делеция в локусе MFS-транспортира). Сопоставление перечня выявленных генотипов с данными европейских стран по анализу инвазивного листериоза показало, что для каждой страны характерен свой спектр генотипов, но ST7 был выявлен во всех рассмотренных выборках.

Выводы. Наряду с контролем производства и хранения продуктов питания своевременная вакцинация от сезонных респираторных инфекций, применение индивидуальных средств защиты в общественных местах могут снизить заболеваемость листериозом в группах риска.

Ключевые слова: листериоз; *Listeria monocytogenes*; генотипирование; MLST; MvLST; коровый геном; cgMLST; пищевая инфекция; грипп.

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания № 056-00034-20-00.

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

Для цитирования: Воронина О.Л., Тартаковский И.С., Ющук Н.Д., Рыжова Н.Н., Аксёнова Е.И., Кунда М.С., Кутузова А.В., Мелкумян А.Р., Карпова Т.И., Груздева О.А., Климова Е.А., Кареткина Г.Н., Чемерис О.Ю., Тарасова Т.А., Дронина Ю.Е., Орлова О.Е., Бурмистрова Е.Н., Цибин А.Н. Анализ спорадических случаев инвазивного листериоза в мегаполисе. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(6): 546–555.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-6-5>

Analysis of sporadic cases of invasive listeriosis in a metropolis

Olga L. Voronina^{1✉}, Igor S. Tartakovskiy¹, Nikolay D. Yuysuk², Natalia N. Ryzhova¹, Ekaterina I. Aksenova¹, Marina S. Kunda¹, Angelika V. Kutuzova¹, Alina R. Melkumyan⁴, Tatyana I. Karpova¹, Olga A. Gruzdeva³, Elena A. Klimova², Galina N. Karetkina², Oksana Yu. Chemeris², Tatyana A. Tarasova¹, Yulia E. Dronina¹, Olga E. Orlova⁵, Elena N. Burmistrova⁶, Aleksander N. Tsibin⁷

¹N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, 123098, Moscow, Russia;

²A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, 127473, Moscow, Russia;

³I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 119992, Moscow, Russia;

⁴F.I. Inozemtsev City Clinical Hospital, 105187, Moscow, Russia;

⁵L.A. Vorokhobov City Clinical Hospital, 123423, Moscow, Russia;

⁶S.S. Yudin City Clinical Hospital, 115446, Moscow, Russia;

⁷Research Institute of Health Organization and Medical Management, 115008, Moscow, Russia

Introduction. Listeriosis is a foodborne infection, especially dangerous for people in at-risk groups. Susceptibility to listeria infection is determined by a complex of reasons: environmental factors, host immune status, and pathogen virulence. The susceptibility to listeriosis can also be aggravated by previous infections, especially viral infections, which demonstrate a steadily increasing number of identified pathogens.

The aim of our study was to present molecular and genetic characterization of pathogens causing sporadic invasive listeriosis in a megalopolis, primarily during the peak of influenza and ARVI incidence.

Materials and methods. *Listeria monocytogenes* isolates were collected from 18 hospitalized patients at hospitals in Moscow, from November 2018 to October 2019. The first comparison group was represented by isolates from food products and fish preserves. The second comparison group included previously examined environmental isolates. The clinical isolates were examined by using multilocus sequence typing techniques, including the standard MLST scheme extended by loci of internalin genes. Isolates of the autochthonous genotype (ST7) were compared through whole-genome sequencing and subsequent analysis of the core genome (cgMLST).

Results. In cases of invasive listeriosis, 44% of isolates were isolated from patients with listeriosis; 27% of isolates were obtained from patients with meningitis. *L. monocytogenes* of phylogenetic lineage II prevailed in these groups of cases that occurred when the epidemic threshold for influenza was crossed during the 2018/2019 season. *Listeria pneumonia* identified in the senior age group occurred during the season of autumn ARVI and was primarily caused by *L. monocytogenes* of phylogenetic lineage I. The examination of genomes of ST7 isolates demonstrated identity between the core genomes of bacteria isolated from the mother-infant pair. Out of ST7 food isolates most closely related to the clinical ones was the isolate from meat (23 locus differences, the common deletion in the MFS transporter locus). Analyzing invasive listeriosis, the comparison between the list of the identified genotypes and the data from European countries showed that each country had its own specific range of genotypes, though ST7 was detected in all the examined samples.

Conclusions. Along with the monitoring of food manufacturing and storage, timely vaccination against seasonal respiratory infections and use of personal protective equipment in public spaces can reduce the risk of listeriosis incidence in at-risk groups.

Keywords: listeriosis; *Listeria monocytogenes*; genotyping; MLST; MvLST; core genome; cgMLST; foodborne infection; influenza.

Acknowledgments. This work was carried out with the financial support of State Assignment No. 056-00034-20-00.

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

For citation: Voronina O.L., Tartakovskiy I.S., Yuysuk N.D., Ryzhova N.N., Aksenova E.I., Kunda M.S., Kutuzova A.V., Melkumyan A.R., Karpova T.I., Gruzdeva O.A., Klimova E.A., Karetkina G.N., Chemeris O.Yu., Tarasova T.A., Dronina Yu.E., Orlova O.E., Burmistrova E.N., Tsibin A.N. Analysis of sporadic cases of invasive listeriosis in a metropolis. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(6): 546–555. (In Russ.).
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-6-5>

Received 28 July 2020
Accepted 8 October 2020

Введение

В условиях пандемии коронавируса особенно наглядно проявилась роль молекулярных методов диагностики в решении эпидемических задач. За короткий промежуток времени в России было разработано и зарегистрировано 19 наборов для ПЦР и изотермической амплификации SARS-CoV-2¹, ак-

тивизирована работа лабораторной службы, позволявшая нарастить объем тестирований, результаты лабораторных тестов стали критерием выхода переболевшего из карантина², полногеномное секве-

¹ URL: <https://fedlab.ru/komitety/meditsinskie-izdela>

² Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)». Версия 6 (28.04.2020). URL: <https://static-1.rosminzdrav.ru/system/attachments/attaches/000/050/116/original>

нирование возбудителя послужило источником информации для разработки вакцины и для контроля эпидемической ситуации. 207 геномов SARS-CoV-2 было депонировано в базе данных GISAID³ российскими исследователями из 31 998, зарегистрированных по состоянию на 26.05.2020.

Пандемия ужаснула мир количеством заразившихся, заболевших и летальностью, которая составила 2,7% в России, но гораздо выше была в США (17,2%) и Италии (18,4%), по данным на 28 мая 2020 г.⁴

В это время, казалось, другие инфекции отступили на второй план. Однако вопросы безопасности пищевых продуктов, их производства и хранения в условиях изоляции стали особенно актуальны уже весной 2020 г. Федеральное управление по безопасности пищевых продуктов и ветеринарии Швейцарии сообщило в мае 2020 г. о вспышке листериоза, вызванной употреблением полутвёрдых сыров производства «Käseerei Vogel AG» (11 заболевших, 2 умерших)⁵. Управление по контролю за продуктами и лекарствами США 09.06.2020 г. проинформировало о завершении вспышки листериоза, начавшейся в марте 2020 г. и вызванной грибами эннки (опёнок зимний, *Flammulina velutipes*) производства Республики Корея (36 заболевших в 17 штатах, 4 умерших)⁶. Расчет летальности при вспышке листериоза в США показал, что она составила 3,8%, тогда как при самой масштабной вспышке в ЮАР в 2017 г. летальность достигла 20,4%⁷ [1], что превышает показатели при текущей пандемии SARS-CoV-2.

Вместе с тем анализ вспышек и спорадических случаев инвазивного листериоза, а также сопоставление сезонов вирусных и листерийных инфекций показывает, что предшествующие вирусные инфекции способствуют заболеванию листериозом в силу нарушения мукоидного слоя желудочно-кишечного тракта при вирусном гастроэнтерите [2]. Впервые такое исследование было выполнено в сезоне декабрь 1986 г. — март 1987 г. в США [3]. Среди обследованных 89% были взрослыми, их средний возраст — 67 лет.

В нашем исследовании 44% выявленных случаев составил перинатальный листериоз, подтвердив опасность листериоза для беременных, восприимчивость которых к листериям выше в 10–24 раза [4] в силу существенного снижения количества Т-клеток в периферической крови, особенно во II и III триместрах беременности [5]. Кроме того, у беременных возрастает вероятность инвазии в эпителиальные клетки кишечника поступивших с пищей листерий, поскольку снижается подвижность кишечника, необходимая для секреции мукуса. В норме мукоидный слой физически захватывает бактерии и изгоняет их из тонкого кишечника в толстый, а также закрывает гликопротеиновые рецепторы на поверхности энтероцитов [6]. При доступности энтероцитов эффективность инвазии определяется специфичностью взаимодействия интерналинов листерий и эпителиального трансмембранного белка Е-кадгерина [7], поэтому в нашем исследовании для сравнения клинических изолятов *Listeria monocytogenes* использовали профиль не только MLST (MultiLocus Sequence Typing), но и интерналинов А, В, С, Е [8]. Для доказательства идентичности или близкородственности изолятов применяли полногеномное секвенирование с последующим анализом корового генома в соответствии с действующими стандартами [9].

В задачу нашего исследования входило молекулярно-генетическое изучение изолятов *L. monocytogenes* из клинических образцов, полученных при выявлении спорадических случаев инвазивного листериоза в мегаполисе преимущественно в период респираторных вирусных инфекций.

Материалы и методы

Изоляты *L. monocytogenes* были выделены от 18 госпитализированных пациентов в стационарах Москвы с ноября 2018 г. по октябрь 2019 г. В первой группе сравнения были использованы изоляты из продуктов питания, проанализированные ранее [8] и зарегистрированные в базе данных Institut Pasteur MLST and whole genome MLST⁸ под ID 42984-42998, а также добавленный к ним изолят GIMC2035:Lmc7218 из рыбных пресервов, выделенный в октябре 2019 г. Во вторую группу сравнения вошли изоляты из окружающей среды, полученные из коллекции ФГБНУ ФИЦВиМ, исследованные ранее [10, 11] и зарегистрированные под ID 5799-5801, 5803-5816.

Выделение клинических изолятов проводили согласно Методическим указаниям по применению унифицированных микробиологических (бактериологических) методов исследования в клинико-диагностических лабораториях⁹. Для инкубации культур

nal/28042020_MR_COVID-19_v6.pdf

³ URL: <http://gisaid.org>

⁴ URL: <https://стопкоронавирус.рф>; <https://www.worldometers.info>

⁵ Whitworth J. Officials report more patients in Listeria outbreak linked to cheese. May 14, 2020. URL: <https://www.foodsafetynews.com/2020/05/more-patients-reported-in-listeria-outbreak-linked-to-cheese>

⁶ Outbreak investigation of *Listeria monocytogenes*: enoki mushrooms (March 2020). URL: <https://www.fda.gov/food/outbreaks-foodborne-illness/outbreak-investigation-listeria-monocytogenes-enoki-mushrooms-march-2020>

⁷ WHO. Disease outbreak. Listeriosis – South Africa. 28 March 2018. URL: <https://www.afro.who.int/health-topics/listeriosis/outbreak/28-march-2018-south-africa>

⁸ URL: <https://bigsdbs.pasteur.fr/listeria>

⁹ Приложение 1 к приказу № 535 от 22.04.1985 Минздрава СССР

использовали колумбийский агар с добавлением 5% дефибринированной бараньей крови («БиоМедиа») и атмосферу 5% CO₂. Время инкубации составило 18–24 ч. Инкубацию и отбор колоний проводили с помощью системы «BD Kiestra™ WCA» («BD»). Для идентификации культур применяли масс-спектрометр «Bruker microflex MALDI-TOF» («Bruker Daltonik GmbH»).

Исследование культур с помощью мультилокусного секвенирования, включавшего анализ 7 генов «домашнего хозяйства» и 4 генов вирулентности (MLST; Multi-virulent-locus sequence typing — MvLST), проводили, как описано ранее [8].

Анализ аллелей MLST и аллельных профилей (ST, Sequence Type) выполняли с помощью ресурсов Bacterial Isolate Genome Sequence Database for *L. monocytogenes* (BIGSdb-Lm)¹⁰ [9]. Проанализированные изоляты и новые аллельные профили депонировали в базе данных сайта (ID 42973–42983, 45724–45731).

Аллели MvLST и IP (Internalin genes (*InlA*, *InlB*, *InlC*, *InlE*) Profile) определяли, используя в качестве референсов опубликованные последовательности [8, 10–13]. Новый вариант аллеля *InlA*, выявленный в ходе данного исследования, зарегистрировали в GenBank (Accession Numbers: MT043268).

Для расчета индекса разнообразия Шеннона использовали формулу:

$$-\sum p_i \times \log_2 p_i,$$

где $p_i = n_i/N$,

где n_i — численность изолятов данного генотипа; N — численность всех изолятов выборки.

Полногеномное секвенирование 4 изолятов *L. monocytogenes* ST7 (GIMC2009:LmcUH4 и GIMC2010:LmcUH8 — клинических; GIMC2015:Lmc22 и GIMC2016:Lmc547 — из продуктов питания) выполняли на платформе «MiSeq Illumina» (картридж MiSeq Reagent Kit v2). Для приготовления библиотек фрагментов использовали набор «КАРА HyperPlus» («Roche»). Качество и размер библиотек оценивали с помощью электрофореза на чипах «Bioanalyzer» («Agilent»). Результаты секвенирования (Sequence Read Archive) депонировали в GenBank NCBI (BioProject ID: PRJNA605697).

Для сборки геномов и анализа SNV (Single Nucleotide Variant) использовали CLC Genomics Workbench v.20. CGView Server применяли для проверки результатов сборки [14]. Аннотацию геномов выполняли с помощью сервера RAST (Rapid Annotations using Subsystems Technology) [15, 16]. Для поиска последовательностей профагов использовали PHASTER (PHAge Search Tool Enhanced Release) [17]. MLST корового генома (cg-MLST) изолятов определяли с помощью ресурсов BIGSdb-Lm [18].

Результаты

Разнообразие генотипов клинических изолятов *L. monocytogenes* в контексте генов MLST

В стационарах Москвы за период наблюдения с ноября 2018 г. по октябрь 2019 г. было выявлено 18 случаев инвазивного листериоза. Перинатальный листериоз составил 44%, диагноз «менингит» поставлен в 27% случаев. Как видно из **таблицы**, менингит, пневмония, листериозный сепсис — диагнозы старшей возрастной группы 59–89 лет. Разнообразие генотипов листерий, выделенных при перинатальном листериозе, было не велико: ST6 филогенетической линии I и ST7 филогенетической линии II. Индекс разнообразия Шеннона (H) для этой группы составил 0,95. Преобладал ST7 — 63% (**рис. 1, а**).

В старшей возрастной группе разнообразие генотипов было выше (H = 2,65), при этом также преобладали генотипы филогенетической линии II (61%), а превалировал ST7 (**рис. 1, б**).

Сравнение выборки клинических изолятов с выборками пищевых изолятов, выделенных из продуктов российского производства, а также изолятов из окружающей среды, полученных из образцов европейской части РФ, показало, что индекс разнообразия выше в последних двух группах (**рис. 1, в, г**). В этих группах также существенно выше доля изолятов филогенетической линии II. Она составляет 94%.

Общим генотипом для всех групп листерий был ST7. ST6 лидировал в группе клинических изолятов филогенетической линии I, но не встречался в группах изолятов из окружающей среды и пищевых продуктов российского производства. Из генотипов филогенетической линии I, выявленных у изолятов из клинических образцов, только ST5 отмечен у изолята из окружающей среды. В филогенетической линии II еще 2 генотипа группы клинических изолятов были выявлены ранее: ST155 — у изолята из пищевых продуктов, ST14 — у изолята из окружающей среды.

Рассмотрим группу перинатального листериоза. Причиной листериозного сепсиса у беременных женщин стала *L. monocytogenes* ST7, что привело как к самым тяжелым последствиям — аборт на 18-й неделе, так и к преждевременным родам (**таблица**). В одном случае своевременное обнаружение *L. monocytogenes* и проведенное лечение способствовали выздоровлению беременной и родоразрешению в срок. Из 5 случаев листериоза новорожденных 2 были вызваны *L. monocytogenes* ST7 и 3 — ST6. Причем у новорожденного из проанализированной пары мать–ребенок (LmcUH4, LmcUH8) была диагностирована врожденная пневмония, что, как правило, происходит при аспирации бактерий в инфицированных родовых путях.

¹⁰ URL: <https://bigsdb.pasteur.fr/listeria>

Характеристика изолятов *L. monocytogenes*, выделенных в стационарах МосквыCharacteristics of *L. monocytogenes* isolates from Moscow hospitals

Изолят Isolate	Филогенетическая линия Phylogenetic line	ST	IP	Дата выделения Isolation date	Пол Gender	Возраст Age	Диагноз Diagnosis	Код диагноза Diagnosis code
GIMC2006: LmcIH1_2	II	7	15	07.03.2019	Ж F	30	Листериозный сепсис, вызвавший самопроизвольный аборт на 18-й неделе Listeria sepsis causing spontaneous abortion at 18 weeks	A32.7; O03
GIMC2028: LmcUH17	II	7	15	13.05.2019	Ж F	32	Листериозная септицемия, выздоровление, благополучно доношенная беременность Listeria septicemia, convalescence, safely term pregnancy	A32.7
GIMC2009: LmcUH4	II	7	15	13.02.2019	Ж F	23	Преждевременные роды Premature birth	O60.0
GIMC2010: LmcUH8	II	7	15	13.02.2019	М M	0	Врожденная пневмония неуточненная Congenital pneumonia, unspecified	P23.9
GIMC2011: LmcUH12	II	7	15	30.11.2018	Ж F	0	Неонатальный диссеминированный листериоз Neonatal disseminated listeriosis	P37.2
GIMC2012: LmcUH1	I	6	44	06.03.2019	Ж F	0	Неонатальный диссеминированный листериоз Neonatal disseminated listeriosis	P37.2
GIMC2002: LmcH67_1	I	6	44	16.03.2019	Ж F	0	Неонатальный диссеминированный листериоз Neonatal disseminated listeriosis	P37.2
GIMC2030: LmcUH19	I	6	44	19.08.2019	М M	0	Генерализованный листериоз, листериозная септицемия Generalized listeriosis, listeria septicemia	A32.7
GIMC2014: LmcSH3	II	14	27	09.11.2018	Ж F	Нет данных No data	Листериоз. Вторичный менингит Listeriosis. Secondary meningitis	G03.9
GIMC2005: LmcIH1_1f	I	241	43	01.02.2019	Ж F	80	Менингит Meningitis	G03.9
GIMC2008: LmcUH14	II	7	15	18.04.2019	М M	59	Менингит Meningitis	G03.9
GIMC2007: LmcIH1_3	II	7	15	25.04.2019	М M	59	Менингит Meningitis	G03.9
GIMC2031: LmcUH20	II	2096	53	19.08.2019	М M	65	Листериозный менингит Listeria meningitis	A32.1
GIMC2013: LmcUH16	I	6	44	25.04.2019	М M	65	Перенесённый инфаркт миокарда Previous myocardial infarction	I25.2
GIMC2029: LmcUH18	II	155	52	09.08.2019	М M	72	Листериозная септицемия Listeria septicemia	A32.7
GIMC2032: LmcINH-1	II	7	15	08.09.2019	Ж F	88	Пневмония Pneumonia	J15.9
GIMC2033: LmcH67-2	I	6	44	01.10.2019	Ж F	89	Пневмония Pneumonia	J15.9
GIMC2034: LmcH67-3	I	5	38	04.10.2019	Ж F	72	Пневмония Pneumonia	J15.9

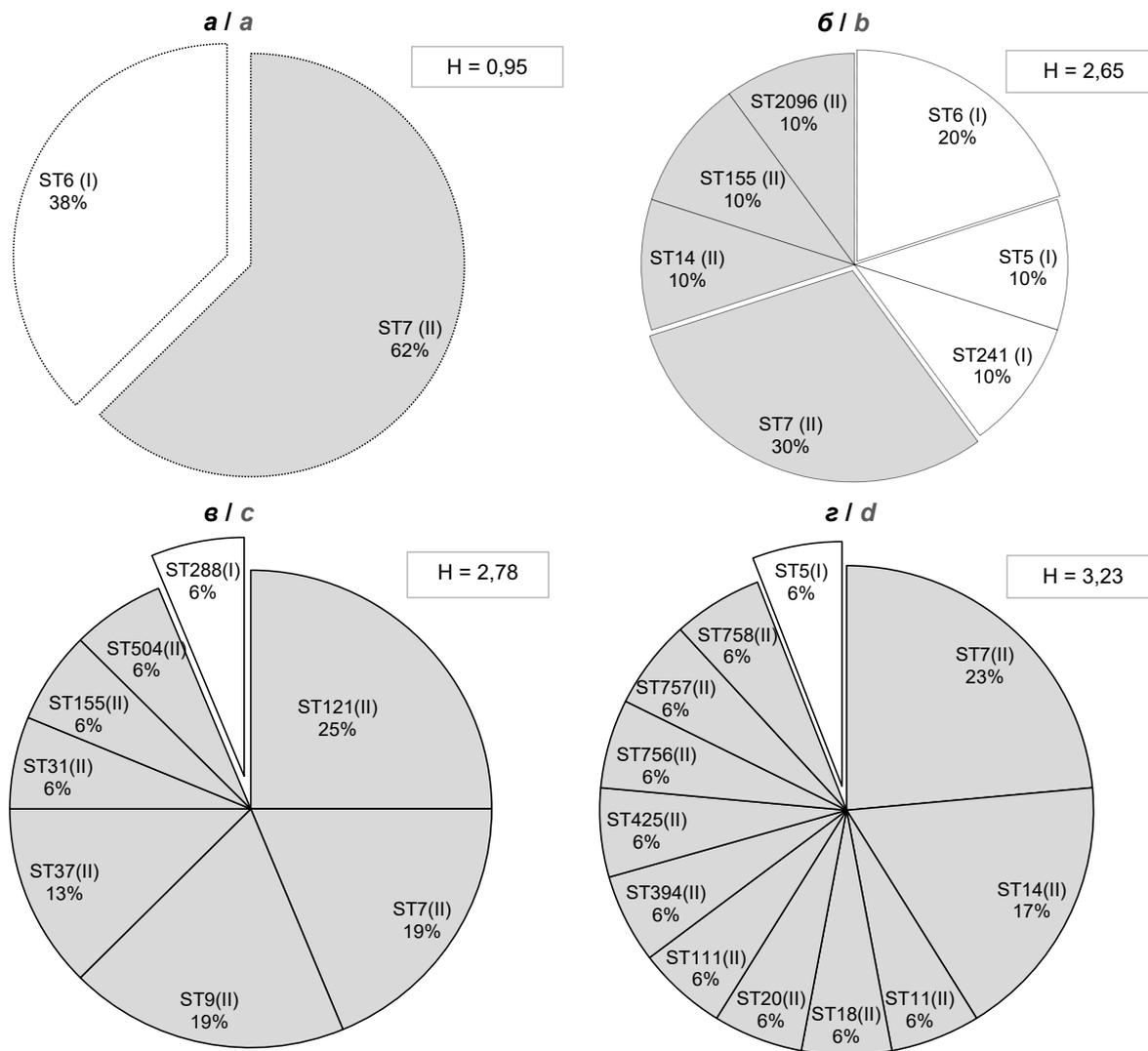


Рис. 1. Доля *L. monocytogenes* филогенетических линий I и II в группах клинических изолятов.

a — перинатальный листериоз; *b* — менингит, пневмония, сепсис в старшей возрастной группе; *в* — в пищевых изолятах; *г* — в изолятах из окружающей среды. В рамке указан индекс разнообразия Шеннона (H). Филогенетическая линия отмечена в скобках. Серым выделением обозначены доли генотипов филогенетической линии II.

Fig. 1. Proportion of *L. monocytogenes* of phylogenetic lineages I and II in the groups of clinical isolates.

a — perinatal listeriosis; *b* — meningitis, pneumonia, and sepsis in the senior age group; *c* — in food isolates; *d* — in environmental isolates. The box shows the Shannon diversity index (H). The phylogenetic lineage is shown in parenthesis. Proportions of genotypes of phylogenetic lineage II are highlighted in grey.

Сроки выделения *L. monocytogenes* в 5 случаях перинатального листериоза максимально приближены к пику заболеваемости гриппом и ОРВИ в Москве в сезоне 2018/2019 гг. — с 28.01.2019 г. по 03.02.2019 г.¹¹ и к пику по гриппу в России — с 04.02.2019 г. по 10.02.2019 г.¹²

В старшей возрастной группе пациенты с менингитом были младше пациентов с листериозной

пневмонией (медиана возраста 62 против 88). Среди возбудителей менингита преобладали *L. monocytogenes* филогенетической линии II. Из 3 случаев пневмонии 2 были вызваны *L. monocytogenes* филогенетической линии I.

Пневмонии пришлись на начало сезона ОРВИ, а менингиты (5 из 6 случаев) — на время высокого уровня заболеваемости гриппом и ОРВИ.

Анализ корового генома изолятов *L. monocytogenes* ST7

Поскольку во всех группах изолятов ST7 составлял существенную долю, мы провели сравнение полных геномов 4 изолятов этого генотипа.

¹¹ Роспотребнадзор информирует об итогах эпидсезона по гриппу и ОРВИ 2018/2019 // На Западе Москвы. 19.08.2019. URL: <https://na-zapade-mos.ru/1023319-rosпотреbnadzor-informiruet-ob-itogax-ehpidsezona-po-grippu-i-orvi-20182019>

¹² НИИ гриппа. Еженедельный бюллетень по гриппу. URL: https://www.influenza.spb.ru/system/epidemic_situation

Клинические изоляты были выделены от родильницы (GIMC2009:LmcUH4) и новорождённого (GIMC2010:LmcUH8). Пищевой изолят (GIMC2015:Lmc22) из охлажденного мяса соответствовал клиническим по аллельному профилю и по профилю интерналинов, изолят из филе цыпленка (GIMC2016:Lmc547) отличался аллелем интерналина А [8].

Анализ геномов с помощью ресурсов BIGSdb-Lm показал, что 2 клинических изолята и изолят из мяса имеют профиль корового генома, близкий к cg-14120, тогда как геном второго пищевого изолята был близок cg-12083. Сопоставление 1748 локусов корового генома изолята новорожденного и пищевых с изолятом родильницы подтвердило, что коровые геномы изолятов матери и ребенка идентичны (рис. 2), изолят из мяса отличался 23 локусами, а изолят из филе цыпленка — 57 локусами. Пищевые изоляты имели 11 общих отличий от клинических изолятов; 12 локусов из 23, отличающих изолят из мяса, были идентичными у клинических изолятов и изолята из филе цыпленка. Следует отметить, что все отличия, за исключением одного локуса, были SNV. В локусе lmo2171, кодирующем MFS (major facilitator superfamily) транспортёр, делеция 3 триплетов была отмечена в клинических изолятах и изоляте из мяса. Эта характерная деталь подчеркивает большее родство изолята GIMC2015:Lmc22 с клиническими изолятами.

Обсуждение

Проведенное исследование показало, что за период наблюдения с ноября 2018 г. по октябрь 2019 г. клинические случаи листериоза распределились по диагнозам в соответствии с возрастом пациентов. Перинатальный листериоз в большинстве случаев пришёлся на зимне-весенний период подъёма заболеваемости гриппом, когда уровень заболеваемости населения был выше базовой линии (72,2 на 10 тыс. человек) и выше еженедельного эпидемиологического порога. В старшей возрастной группе 4 из 5 случаев менингита коррелировали с периодом высокой заболеваемости гриппом, тогда как заболевание листериозной пневмонией совпало по времени с осенним сезоном ОРВИ.

Особое внимание мы уделили случаям перинатального листериоза, составившим 44% выборки клинических изолятов. Сопоставление наших данных с результатами исследования клинических случаев в Германии периода 2013–2018 гг. показало существенно более низкое количество перинатального листериоза в немецкой выборке: 7% [19]. Разнообразие генотипов изолятов, представленных в немецком исследовании, было минимальным (CC5 и CC7), как в группе перинатального листериоза в нашей выборке, однако доля изолятов филогенетической линии I была значительно выше, чем изоля-

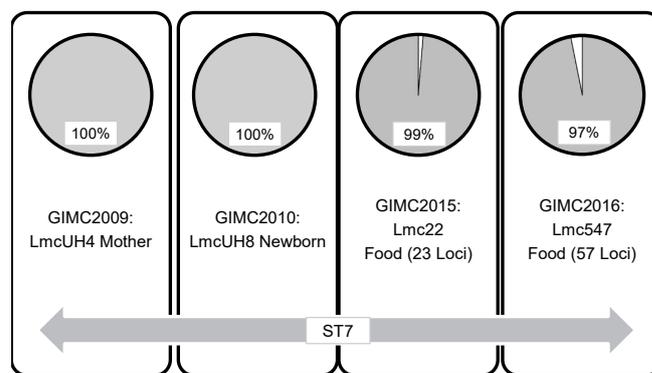


Рис. 2. Результаты сравнения 1748 локусов корового генома для геномов 4 изолятов ST7.

В скобках указано количество локусов корового генома, отличающихся от клинических образцов.

Fig. 2. Comparison of 1,748 core genome loci for the genomes of 4 ST7 isolates.

The number of loci of the core genome that differ from clinical samples is indicated in parentheses.

тов филогенетической линии II (8%/16%) [18]. В нашей выборке, напротив, преобладали изоляты филогенетической линии II (77%), доля ST7 составила 39%. Изоляты филогенетической линии I в российской и немецкой выборках различались по составу генотипов. В нашей выборке ST5 был представлен только 1 изолятом, а лидировал ST6. В то же время следует отметить, что штаммы аутохтонного для России ST7 вызывали заболевание и в Германии.

При исследовании случаев инвазивного листериоза в Австрии в 2017 г. полученные данные по генотипированию были ближе к нашим результатам. Доля изолятов филогенетической линии II составила 58%, I — 39%, III — 3%. Лидировали по встречаемости ST1, 155, 451 и CC7 [18]. Таким образом, в Австрии CC7 также отмечен у клинических изолятов. Заметим, что среди изолятов филогенетической линии I в австрийской выборке ST6 встретился только 1 раз, тогда как в нашей выборке изоляты с ST6 составили 28%.

На примере выборок клинических изолятов из 3 стран мы видим, что достаточно большой перечень генотипов характеризует изоляты, ставшие причиной инвазивного листериоза, однако каждая территория имеет свои особенности, определяющие преобладание штаммов той или иной филогенетической линии. Вместе с тем изоляты ST7 (CC7) встречались во всех выборках.

Полногеномное секвенирование изолятов ST7 показало, что можно подтвердить передачу штамма от матери ребенку, поскольку коровые геномы штаммов полностью совпали. В исследовании A. Moura и соавт., предложивших универсальную схему анализа корового генома *L. monocytogenes*, состоящего из 1748 локусов, также было продемонстрировано, что пары изолятов при вертикальной

передаче от матери к новорожденному не имеют аллельных отличий [9].

Вопрос критерия отнесения изолятов *L. monocytogenes* к одной вспышке на основе cgMLST рассмотрен в 2 публикациях: в упомянутом исследовании А. Moura и соавт., выполненном на выборке из 957 геномов [9], и в работе W. Ruppitsch и соавт., включившей в анализ 67 геномов из австрийской коллекции [20]. Порог отнесения геномов к одной вспышке составил не более 7 [9] и 10 отличающихся локусов [20]. Опираясь на эти критерии, мы не можем считать пищевой изолят G1MC2015:Lmc22 из охлажденного мяса участником того эпидемического процесса, который повлек заболевание родильницы, тем более что и выделен он был на 9 мес раньше клинического изолята. Тем не менее наличие общей делеции в геномах клинического и пищевого изолятов при 23 локусах отличий позволяет охарактеризовать эти изоляты как близкородственные.

Заключение

Проведенное исследование спорадических случаев листериоза в мегаполисе показало увеличение заболеваемости листериозом, особенно среди беременных, в период превышения эпидемического порога по гриппу и ОРВИ. Своевременная вакцинация от гриппа и ОРВИ, применение индивидуальных средств защиты в общественных местах, ставшее нормой в период эпидемии коронавируса, могут стать дополнительными направлениями профилактики листериоза, наряду с обязательным контролем производства и хранения продуктов питания.

При анализе клинических случаев инвазивного листериоза возрастает роль молекулярно-генетических методов. Мультилокусное секвенирование 11 генов или экспресс-вариант, включающий 3 локуса, позволяют оперативно проводить эпидемиологическое расследование спорадических случаев, а также уточнять идентификацию *L. monocytogenes* при микробиологическом обследовании беременных женщин в ходе профилактического мониторинга. При расследовании эпидемической вспышки пищевой инфекции (групповых случаев листериоза) и поиске продукта — источника заражения необходимо полногеномное секвенирование изолятов с анализом корового генома и определением количества локусов, отличающих клинические и пищевые изоляты.

Для практической реализации данного подхода необходима подготовка новых методических документов национального уровня, регламентирующих комплекс современных молекулярно-генетических и микробиологических методов, обеспечивающих эффективную профилактику и диагностику листериоза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Smith A.M., Tau N.P., Smouse S.L., Allam M., Ismail A., Ramlwa N.R., et al. Outbreak of *Listeria monocytogenes* in South Africa, 2017–2018: Laboratory activities and experiences associated with wholegenome sequencing analysis of isolates. *Foodborne Pathog. Dis.* 2019;16(7): 524–30. <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2586>
2. Schlech W.F. Epidemiology and clinical manifestations of *Listeria monocytogenes* infection. *Microbiol. Spectr.* 2019; 7(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0014-2018>
3. Schwartz B., Hexter D., Broome C.V., Hightower A.W., Hirschhorn R.B., Porter J.D., et al. Investigation of an outbreak of listeriosis: new hypotheses for the etiology of epidemic *Listeria monocytogenes* infections. *J. Infect. Dis.* 1989; 159(4): 680–5. <https://doi.org/10.1093/infdis/159.4.680>
4. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Vital signs: Listeria illnesses, deaths, and outbreaks — United States, 2009–2011. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2013; 62(22): 448–52.
5. Sridama V., Pacini F., Yang S.L., Moawad A., Reilly M., DeGroot L.J. Decreased levels of helper T cells: a possible cause of immunodeficiency in pregnancy. *N. Engl. J. Med.* 1982; 307(6): 352–6. <https://doi.org/10.1056/NEJM198208053070606>
6. Navaneethan U., Giannella R.A. Mechanisms of infectious diarrhea. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* 2008; 5(11): 637–47. <https://doi.org/10.1038/ncpgasthep1264>
7. Madjunkov M., Chaudhry S., Ito S. Listeriosis during pregnancy. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2017; 296(2): 143–52. <https://doi.org/10.1007/s00404-017-4401-1>
8. Воронина О.Л., Кунда М.С., Рыжова Н.Н., Кутузова А.В., Аксенова Е.И., Карпова Т.И. и др. Листериоз. Генотипирование как ключ к выявлению возможного источника заражения. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2019; 21(4): 261–73. <https://doi.org/10.36488/cmasc.2019.4.261273>
9. Moura A., Criscuolo A., Pouseele H., Maury M.M., Leclercq A., Tarr C., et al. Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*. *Nat. Microbiol.* 2016; 2: 16185. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.185>
10. Воронина О.Л., Кунда М.С., Рыжова Н.Н., Аксенова Е.И., Семенов А.Н., Курнаева М.А. и др. Закономерности селекции полигостальных убиквитарных микроорганизмов на примере представителей трех таксонов. *Молекулярная биология.* 2015; 49(3): 430–41. <https://doi.org/10.7868/S0026898415030179>
11. Voronina O.L., Ryzhova N.N., Kunda M.S., Kurnaeva M.A., Semenov A.N., Aksenova E.I., et al. Diversity and pathogenic potential of *Listeria monocytogenes* isolated from environmental sources in the Russian Federation. *International Journal of Modern Engineering Research (IJMER).* 2015; 5(3): 5–15.
12. Adgamov R., Zaytseva E., Thiberge J.M., Brisse S., Ermolaeva S. Genetically related *Listeria monocytogenes* strains isolated from lethal human cases and wild animals. In: Caliskan M., ed. *Genetic Diversity in Microorganisms.* Rijeka: InTech; 2012. Ch. 9.
13. Psareva E.K., Egorova I.Y., Liskova E.A., Razheva I.V., Gladkova N.A., Sokolova E.V., et al. Retrospective Study of *Listeria monocytogenes* isolated in the territory of inner Eurasia from 1947 to 1999. *Pathogens.* 2019; 8(4): 184. <https://doi.org/10.3390/pathogens8040184>
14. Grant J.R., Stothard P. The CGView Server: a comparative genomics tool for circular genomes. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36(Web Server issue): W181–4. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn179>
15. Aziz R.K., Bartels D., Best A.A., DeJongh M., Disz T., Edwards R.A., et al. The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics.* 2008; 9: 75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>

16. Overbeek R., Begley T., Butler R.M., Choudhuri J.V., Chuang H.Y., Cohoon M., et al. The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33(17): 5691–702. <https://doi.org/10.1093/nar/gki866>
17. Arndt D., Grant J., Marcu A., Sajed T., Pon A., Liang Y., et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44(W1): W16–21. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw387>
18. Cabal A., Pietzka A., Huhulescu S., Allerberger F., Ruppitsch W., Schmid D. Isolate-based surveillance of *Listeria monocytogenes* by whole genome sequencing in Austria. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 2282. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02282>
19. Lüth S., Halbedel S., Rosner B., Wilking H., Holzer A., Roedel A., et al. Backtracking and forward checking of human listeriosis clusters identified a multiclonal outbreak linked to *Listeria monocytogenes* in meat products of a single producer. *Emerg. Microbes Infect.* 2020; 9(1): 1600–8. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1784044>
20. Ruppitsch W., Pietzka A., Prior K., Bletz S., Fernandez H.L., Allerberger F., et al. Defining and evaluating a core genome multilocus sequence typing scheme for whole-genome sequence-based typing of *Listeria monocytogenes*. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53(9): 2869–76. <https://doi.org/10.1128/JCM.01193-15>
9. Moura A., Criscuolo A., Pouseele H., Maury M.M., Leclercq A., Tarr C., et al. Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*. *Nat. Microbiol.* 2016; 2: 16185. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.185>
10. Voronina O.L., Kunda M.S., Ryzhova N.N., Aksenova E.I., Semenov A.N., Kurnaeva M.A., et al. The regularities of the ubiquitous polyhostal microorganisms selection by the example of three taxa. *Molekulyarnaya biologiya.* 2015; 49(3): 430–41. <https://doi.org/10.7868/S0026898415030179> (in Russian)
11. Voronina O.L., Ryzhova N.N., Kunda M.S., Kurnaeva M.A., Semenov A.N., Aksenova E.I., et al. Diversity and pathogenic potential of *Listeria monocytogenes* isolated from environmental sources in the Russian Federation. *International Journal of Modern Engineering Research (IJMER).* 2015; 5(3): 5–15.
12. Adgamov R., Zaytseva E., Thiberge J.M., Brisse S., Ermolava S. Genetically related *Listeria monocytogenes* strains isolated from lethal human cases and wild animals. In: Caliskan M., ed. *Genetic Diversity in Microorganisms.* Rijeka: InTech; 2012. Ch. 9.
13. Psareva E.K., Egorova I.Y., Liskova E.A., Razheva I.V., Gladkova N.A., Sokolova E.V., et al. Retrospective Study of *Listeria monocytogenes* isolated in the territory of inner Eurasia from 1947 to 1999. *Pathogens.* 2019; 8(4): 184. <https://doi.org/10.3390/pathogens8040184>
14. Grant J.R., Stothard P. The CGView Server: a comparative genomics tool for circular genomes. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36(Web Server issue): W181–4. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn179>
15. Aziz R.K., Bartels D., Best A.A., DeJongh M., Disz T., Edwards R.A., et al. The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics.* 2008; 9: 75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>
16. Overbeek R., Begley T., Butler R.M., Choudhuri J.V., Chuang H.Y., Cohoon M., et al. The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33(17): 5691–702. <https://doi.org/10.1093/nar/gki866>
17. Arndt D., Grant J., Marcu A., Sajed T., Pon A., Liang Y., et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44(W1): W16–21. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw387>
18. Cabal A., Pietzka A., Huhulescu S., Allerberger F., Ruppitsch W., Schmid D. Isolate-based surveillance of *Listeria monocytogenes* by whole genome sequencing in Austria. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 2282. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02282>
19. Lüth S., Halbedel S., Rosner B., Wilking H., Holzer A., Roedel A., et al. Backtracking and forward checking of human listeriosis clusters identified a multiclonal outbreak linked to *Listeria monocytogenes* in meat products of a single producer. *Emerg. Microbes Infect.* 2020; 9(1): 1600–8. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1784044>
20. Ruppitsch W., Pietzka A., Prior K., Bletz S., Fernandez H.L., Allerberger F., et al. Defining and evaluating a core genome multilocus sequence typing scheme for whole-genome sequence-based typing of *Listeria monocytogenes*. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53(9): 2869–76. <https://doi.org/10.1128/JCM.01193-15>

REFERENCES

1. Smith A.M., Tau N.P., Smouse S.L., Allam M., Ismail A., Rimalwa N.R., et al. Outbreak of *Listeria monocytogenes* in South Africa, 2017–2018: Laboratory activities and experiences associated with wholegenome sequencing analysis of isolates. *Foodborne Pathog. Dis.* 2019; 16(7): 524–30. <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2586>
2. Schlech W.F. Epidemiology and clinical manifestations of *Listeria monocytogenes* infection. *Microbiol. Spectr.* 2019; 7(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0014-2018>
3. Schwartz B., Hexter D., Broome C.V., Hightower A.W., Hirschhorn R.B., Porter J.D., et al. Investigation of an outbreak of listeriosis: new hypotheses for the etiology of epidemic *Listeria monocytogenes* infections. *J. Infect. Dis.* 1989; 159(4): 680–5. <https://doi.org/10.1093/infdis/159.4.680>
4. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Vital signs: Listeria illnesses, deaths, and outbreaks — United States, 2009–2011. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2013; 62(22): 448–52.
5. Sridama V., Pacini F., Yang S.L., Moawad A., Reilly M., DeGroot L.J. Decreased levels of helper T cells: a possible cause of immunodeficiency in pregnancy. *N. Engl. J. Med.* 1982; 307(6): 352–6. <https://doi.org/10.1056/NEJM198208053070606>
6. Navaneethan U., Giannella R.A. Mechanisms of infectious diarrhea. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* 2008; 5(11): 637–47. <https://doi.org/10.1038/ncpgasthep1264>
7. Madjunkov M., Chaudhry S., Ito S. Listeriosis during pregnancy. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2017; 296(2): 143–52. <https://doi.org/10.1007/s00404-017-4401-1>
8. Voronina O.L., Kunda M.S., Ryzhova N.N., Kutuzova A.V., Aksenova E.I., Karpova T.I., et al. Listeriosis: genotyping as a key for identification a possible source of infection. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya.* 2019; 21(4): 261–73. <https://doi.org/10.36488/cmasc.2019.4.261273> (in Russian)

Сведения об авторах

Воронина Ольга Львовна[✉] — к.б.н., доц., зав. лаб. анализа геномов ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-7206-3594>.
E-mail: olv550@gmail.com

Information about the authors

Olga L. Voronina[✉] — Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Head, Laboratory of genome analysis, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-7206-3594>.
E-mail: olv550@gmail.com

Тартаковский Игорь Семенович — д.б.н., проф., зав. лаб. легионеллеза ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4825-8951>.

Ющук Николай Дмитриевич — д.м.н., проф., академик РАН, зав. кафедрой инфекционных болезней и эпидемиологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1928-4747>.

Рыжова Наталья Николаевна — к.б.н., с.н.с. лаб. анализа геномов ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-5361-870X>.

Кунда Марина Сергеевна — к.б.н., с.н.с. лаб. анализа геномов ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0003-1945-0397>.

Аксёнова Екатерина Ивановна — к.б.н., с.н.с. лаб. анализа геномов ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2704-6730>.

Кутузова Анжелика Витальевна — лаборант-исследователь лаб. анализа геномов ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4347-1526>.

Мелкумян Алина Рантиковна — к.м.н., зав. центром лабораторной диагностики ГКБ № 36 им. Ф.И. Иноземцева ДЗМ, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5494-415X>.

Карпова Татьяна Игоревна — д.б.н., в.н.с. лаб. легионеллеза ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9633-7876>.

Груздева Ольга Александровна — д.м.н., доц. кафедры эпидемиологии ПМГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1244-1925>.

Климова Елена Анатольевна — д.м.н., проф. каф. инфекционных болезней и эпидемиологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4319-8144>.

Кареткина Галина Николаевна — к.м.н., доц. кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7850-2826>.

Чемерис Оксана Юрьевна — ассистент кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3395-1246>.

Тарасова Татьяна Анатольевна — н.с. лаб. легионеллеза ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2507-9942>.

Дронина Юлия Евгеньевна — к.м.н., с.н.с. лаб. легионеллеза ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6269-2108>.

Орлова Ольга Евгеньевна — к.м.н., зав. лаб. микробиологии ГКБ № 67 им. Л.А. Ворохобова ДЗМ, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7210-1116>.

Бурмистрова Елена Николаевна — зав. лаб. микробиологии ГКБ № 7 им. С.С. Юдина ДЗМ, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4757-3845>.

Цибин Александр Николаевич — к.м.н., зав. организационно-методическим отделом по клинической лабораторной диагностике НИИОЗММ ДЗМ, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0169-4820>.

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Igor S. Tartakovsky — D. Sci. (Biol.), Prof., Head, Laboratory of legionellosis, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4825-8951>.

Nikolay D. Yuyschuk — D. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, Head, Department of infectious diseases and epidemiology, A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1928-4747>.

Natalia N. Ryzhova — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of genome analysis, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-5361-870X>.

Marina S. Kunda — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of genome analysis, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0003-1945-0397>.

Ekaterina I. Aksenova — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of genome analysis, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2704-6730>.

Angelika V. Kutuzova — research laboratory assistant, Laboratory of genome analysis, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4347-1526>.

Alina R. Melkumyan — Cand. Sci. (Med.), Head, Laboratory diagnostics center, F.I. Inosemtsev City Clinical Hospital, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5494-415X>.

Tatyana I. Karpova — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of legionellosis, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9633-7876>.

Olga A. Gruzdeva — D. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Department of epidemiology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1244-1925>.

Elena A. Klimova — D. Sci. (Med.), Prof., Department of infectious diseases and epidemiology, A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4319-8144>.

Galina N. Karetkina — Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Department of infectious diseases and epidemiology, A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7850-2826>.

Oksana Yu. Chemeris — assistant, Department of infectious diseases and epidemiology, A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3395-1246>.

Tatyana A. Tarasova — researcher, Laboratory of legionellosis, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2507-9942>.

Yulia E. Dronina — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of legionellosis, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6269-2108>.

Olga E. Orlova — Cand. Sci. (Med.), Head, Laboratory of microbiology, L.A. Vorokhobov City Clinical Hospital, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7210-1116>.

Elena N. Burmistrova — Head, Laboratory of microbiology, S.S. Yudin City Clinical Hospital, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4757-3845>.

Aleksander N. Tsibin — Cand. Sci. (Med.), Head, Organizational and methodological department for clinical laboratory diagnostics, Research Institute of Health Organization and Medical Management, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0169-4820>.

Contribution: the authors contributed equally to this article.



Филогенетический анализ родства штаммов *Klebsiella pneumoniae* по генам *uge* и *fim*

Устюжанин А.В.[✉], Чистякова Г.Н., Ремизова И.И.

ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества»,
620028, Екатеринбург, Россия

Введение. В настоящее время недостаточно данных о том, какова частота встречаемости штаммов *Klebsiella pneumoniae* с генами факторов вирулентности *uge* и *fim* среди женщин и новорожденных, что диктует необходимость проведения исследования распространенности *K. pneumoniae* (*uge*⁺, *fim*⁺) и определения степени гетерогенности выделенной популяции бактерий среди детей и взрослых.

Цель исследования — филогенетический анализ генов *uge* и *fim* штаммов *K. pneumoniae* для оценки гетерогенности изучаемой популяции и возможной кластеризации по локусу колонизации, временной и территориальной принадлежности.

Материалы и методы. Исследовано 65 штаммов *K. pneumoniae*, выделенных от 39 новорожденных и 24 женщин из проб фекалий, крови, мочи, последа, отделяемого цервикального канала, зева, шва. Две гемокультуры получены от одного пациента с интервалом в 2 нед, и 2 изолята выделены из отделяемого цервикального канала и шва одной пациентки. Детекцию наличия генов проводили методом полимеразной цепной реакции, нуклеотидные последовательности генов определяли секвенированием по Сэнгеру.

Результаты исследования. Частота встречаемости гена *uge* составила 53,8%, *fim* — 23,1%, что свидетельствует о большей распространенности в штаммах гена *uge*, чем *fim* ($p < 0,001$). Проведенный филогенетический анализ 18 нуклеотидных последовательностей гена *uge* и 4 нуклеотидных последовательностей гена *fim* показал, что штаммы распределились по 7 и 4 кластерам соответственно. Установлено, что как по гену *uge*, так и по *fim* нет четкой кластеризации по временной и территориальной принадлежности, возрасту пациента, биологическому материалу.

Обсуждение. Результаты филогенетического анализа демонстрируют генетическую гетерогенность изучаемой популяции *K. pneumoniae*, что подтверждено широкой географией и временем выявления наиболее генетически близких бактериальных изолятов.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*; филогенетический анализ; ген *uge*; ген *fim*.

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

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

Для цитирования: Устюжанин А.В., Чистякова Г.Н., Ремизова И.И. Филогенетический анализ родства штаммов *Klebsiella pneumoniae* по генам *uge* и *fim*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2020; 97(6): 556–563.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-6-6>

Поступила 30.06.2020

Принята в печать 14.10.2020

The relatedness of *Klebsiella pneumoniae* strains based on phylogenetic analysis of *uge* and *fim* genes

Aleksander V. Ustyuzhanin[✉], Guzel' N. Chistyakova, Irina I. Remizova

Ural Scientific Research Institute of Maternity and Child Care, 620028, Yekaterinburg, Russia

Introduction. Currently, there is insufficient data on the prevalence of *Klebsiella pneumoniae* strains with virulence factors genes *uge* and *fim* among women and newborns. This indicates the need for a study of the prevalence of *K. pneumoniae* (*uge*⁺, *fim*⁺) and the degree of heterogeneity of the bacterial population isolated from children and adults.

The **aim** of the study was to perform a phylogenetic analysis of the *uge* and *fim* genes of the *K. pneumoniae* strains.

Materials and methods. Total 65 strains of *K. pneumoniae* isolated from samples of feces, blood, urine, placenta, cervical canal, pharynx, suture of 39 newborns and 24 women were studied. Two blood cultures were obtained from one patient with an interval of two weeks, and two isolates were obtained from the separated cervical canal

and suture of one patient. The presence of genes was detected by PCR, nucleotide sequences of the genes were determined by Sanger sequencing.

Results. The frequency of detection of the *uge* gene was 53.8% (35 of 65), *fim* gene — 23.1% (15 of 65), which indicates a higher prevalence of *uge* gene strains compared to *fim* ($p < 0.001$). The phylogenetic analysis of 18 nucleotide sequences of the *uge* gene and 4 of the *fim* gene demonstrated that the strains were distributed in 7 and 4 clusters, respectively. It was established that for, there are no clear clustering by time and place of isolation, patient age, and type of biological material was observed for both *uge* and *fim* genes.

Discussion. The results of phylogenetic analysis demonstrate the genetic heterogeneity of the studied population of *K. pneumoniae*, which is confirmed by the wide geography and time variations in detection of the most genetically close bacterial isolates.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*; phylogenetic analysis; *uge* gene; *fim* gene.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

For citation: Ustyuzhanin A.V., Chistyakova G.N., Remizova I.I. The relatedness of *Klebsiella pneumoniae* strains based on phylogenetic analysis of *uge* and *fim* genes. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(6): 556–563. (In Russ.).
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-6-6>

Received 30 June 2020
Accepted 14 October 2020

Введение

Klebsiella pneumoniae часто колонизирует кишечник детей и взрослых без клинических и лабораторных признаков микробного воспаления, в то же время указанный вид бактерий может быть оппортунистическим этиологическим агентом пневмонии, абсцесса, бактериемии, инфекции мочевыводящих путей [1], неонатального сепсиса [2, 3]. Одним из возбудителей внутрибольничных, в том числе гнойно-септических, инфекций являются полирезистентные к антибиотикам и устойчивые к дезинфектантам штаммы *K. pneumoniae* [4–6].

Среди представителей семейства энтеробактерий, с которыми ассоциировано развитие осложненных инфекционного характера у новорожденных в отделении реанимации, на долю *K. pneumoniae* приходится 48% [7]. В этиологической структуре пневмоний с летальным исходом у взрослого населения штаммы *K. pneumoniae* выявлены в 27,27% случаев [8]. В настоящее время выделяют две эволюционно сложившиеся линии, отличающиеся по степени вирулентности. Одну представляют так называемые классические штаммы, вторую — вирулентные, с выраженной продукцией слизи [9].

J.M. Vargas и соавт. описывают 16 генов вирулентности, имеющих разный вклад в патогенный потенциал [10]. Другие авторы также приводят результаты аналогичных исследований различных генов *K. pneumoniae* [9, 11], выделенных при обследовании пациентов с различной выраженностью клинических проявлений в стационарах хирургического, пульмонологического, травматологического профилей, отделениях реанимации и интенсивной терапии. В то же время недостаточно данных, характеризующих бактериальные изоляты, обнаруженные в пробах кала новорожденных, в том числе недоношенных детей.

Значимость гена *uge* в реализации факторов патогенности, согласно исследованиям M.A. Regué (2004), заключается в кодировании фермента уридин-дифосфат-галактуронат-4-эпимеразы, необходимого для синтеза липополисахарида — компонента клеточной стенки грамотрицательных бактерий. При этом показано, что инактивация гена *uge* приводит к формированию авирулентных для лабораторных животных штаммов [12]. Распространенность генов в штаммах *K. pneumoniae* варьирует, по данным разных авторов, от 80% [12, 13] до 90% [14]. У детей с гастроинтестинальными расстройствами данный показатель составляет 83,3% [15].

Ген *fimH* определяет синтез фимбрий, нитевидных структур белковой природы, расположенных на поверхности бактерий и обеспечивающих адгезию штаммов к клеткам хозяина [16]. Прикрепление к поверхности слизистых оболочек способствует бактериальной колонизации, формированию резистентности к факторам иммунной защиты и реализации патогенного потенциала за счет механического соединения с субстратом. Данный ген играет важную роль в развитии инфекций мочевыводящих путей [10].

В настоящее время недостаточно данных о том, какова частота встречаемости штаммов *K. pneumoniae* с генами факторов вирулентности *uge* и *fim* среди женщин, планирующих беременность, беременных, рожениц и родильниц, а также новорожденных. Это диктует необходимость проведения дальнейшего исследования распространенности *K. pneumoniae* (*uge*⁺, *fim*⁺) и определения степени гетерогенности выделенной популяции бактерий среди детей и взрослых. Оценить степень генетического разнообразия штаммов позволит филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей указанных генов.

Цель исследования — провести филогенетический анализ генов *ige* и *fim* штаммов *K. pneumoniae* для оценки гетерогенности изучаемой популяции и возможной кластеризации по локусу колонизации, временной и территориальной принадлежности.

Материалы и методы

Всего исследовано 65 штаммов *K. pneumoniae*, выделенных от 39 новорожденных и 24 женщин из проб фекалий (38), крови (2), мочи (3), последа (1), отделяемого цервикального канала (19), зева (1), шва (1). Две гемокультуры получены от одного пациента с интервалом в 2 нед, и 2 изолята выделены из отделяемого цервикального канала и шва одной пациентки. Биологический материал поступил в бактериологическую лабораторию от недоношенных детей, рожденных от матерей с различным сроком гестации (25–36 нед ± 3 дня), 3 женщин, планирующих беременность, 13 беременных, 5 рожениц и 3 родильниц.

Сбор клинического материала для исследования осуществляли в стерильные лабораторные контейнеры для взятия проб объемом 60 мл с завинчивающейся крышкой и ложкой. Пробы биологического материала транспортировали и хранили в соответствии с СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности». Для культивирования бактерий посев материала выполняли на среду Эндо (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия), кровяно-сыровоточный агар (основа — «Conda»; эритроциты барана — «ЭКОлаб»; сыворотка крови крупного рогатого скота — «БиолоТ»). Идентификацию штаммов *K. pneumoniae* и определение их антибиотикочувствительности проводили с использованием автоматического анализатора «VITEK 2 compact» («Bio Mérieux»).

ДНК бактериальных клеток выделяли из взвеси суточной культуры с использованием набора ДНК-экстран-2 («Синтол») согласно инструкции производителя. Наличие генов *ige* определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием реагентов, праймеров для гена *ige* 5'-TCTTACGCCTTCTCACT-3', 5'-GATCATC-CGGTCTCCCTGTA-3' и для *fimH* (кодирует белок фимбрий первого типа) 5'-TGCTGCTGGGCTG-GTTCGATG-3', 5'-GGGAGGGTGACGGTGACATC-3' производства ООО «Синтол». Визуализацию ПЦР продуктов осуществляли в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I в режиме реального времени на детектирующем амплификаторе «iCycler iQ5» («Bio Rad»). В состав смеси для амплификации входили 50 мкл реакционной смеси: 2,5× ПЦР буфер Б (KCl, ТрисHCl pH 8,8, 6,25 mM MgCl₂), Syp-Taq ДНК-полимеразы, глицерол, Твин 20; дезоксинуклеозидтрифосфаты, 5 мкл dd H₂O, 25 mM MgCl₂, по 1 мкл каждого праймера и 3,5 мкл

образца ДНК. Режим амплификации: первоначальная денатурация — 5 мин при 95°C, последующие 35 циклов — 15 с при 94°C; отжига праймеров — 20 с при 55°C для *ige* и 60°C для *fim*; элонгации — 30 с при 72°C. Завершающим этапом каждого цикла была детекция продуктов амплификации.

Для оценки статистической значимости различий частоты встречаемости генов *ige* и *fim* в штаммах *K. pneumoniae* использовали программу статистической обработки данных SPSS, критерии χ^2 Пирсона с поправкой Йейтса, V Крамера.

Секвенирование генов *ige* и *fim* проводили по методу Сэнгера [17]. Типирование полученных последовательностей осуществляли с использованием Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)¹.

Выравнивание, филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программы Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA), версия 6 [18].

Филограммы были построены по алгоритму «ближайшего соседа» с использованием нуклеотидных последовательностей, депонированных в GenBank.

Расчет эволюционных дистанций между последовательностями производили согласно двухпараметрической модели М. Кимуры (Kimura 2-parameter). Статистическую значимость топологии филограммы оценивали методом повторных выборок на основании анализа 1000 псевдореплик. Достоверными считали построения дендрограммы при индексе в узлах не менее 70.

Результаты

При исследовании 65 штаммов *K. pneumoniae*, выделенных от пациентов учреждения родовспоможения, частота встречаемости гена *ige* составила 53,8% (35 из 65), *fim* — 23,1% (15 из 65), что свидетельствует о большей распространенности в изученных штаммах гена *ige*, чем *fim* ($p < 0,001$). Частота встречаемости гена *ige* ниже, чем в результатах, опубликованных в литературе [12–14], что может быть связано с характеристикой исследуемой выборки пациентов, которые были госпитализированы в многопрофильные или специализированные стационары с нозологической формой клебсиеллезной этиологии. Сравнительный анализ *K. pneumoniae*, выделенных от новорожденных детей и женщин, не продемонстрировал статистически значимых различий в частоте встречаемости вышеуказанных генов. Так, в группе штаммов, выделенных у детей, *ige* детектирован в 62,5% случаев (25 из 40), у женщин — в 40% (10 из 25; $p = 0,130$). Ген *fim* обнаружен в 17,5% штаммов (7 из 40), выделенных от детей, и в 32% штаммов (8 из 25), выделенных от женщин ($p = 0,295$). Оба

¹ URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

гена были выявлены в 18,4% случаев (12 из 65), из них в 28% штаммов, выделенных от женщин, и в 12,5%, выделенных от детей ($p = 0,216$).

Для определения степени генетического родства проанализировано 18 нуклеотидных последовательностей гена *uge*, полученных в результате секвенирования по Сэнгеру. Проведенный филогенетический анализ показал, что все штаммы распределились по 7 кластерам (рис. 1).

В первый кластер вошли два штамма, выделенные из проб фекалий от пациентов двух педиатрических отделений в апреле и марте 2019 г., и близкородственные им штаммы, выделенные на Тайване в 2014 г. (AB924589), в США в 2006 г. (CP000647) и Таиланде в 2012 г. (CP035210).

Во второй кластер распределились два штамма, выделенные также из проб фекалий новорожденных детей из отделения патологии новорождённых

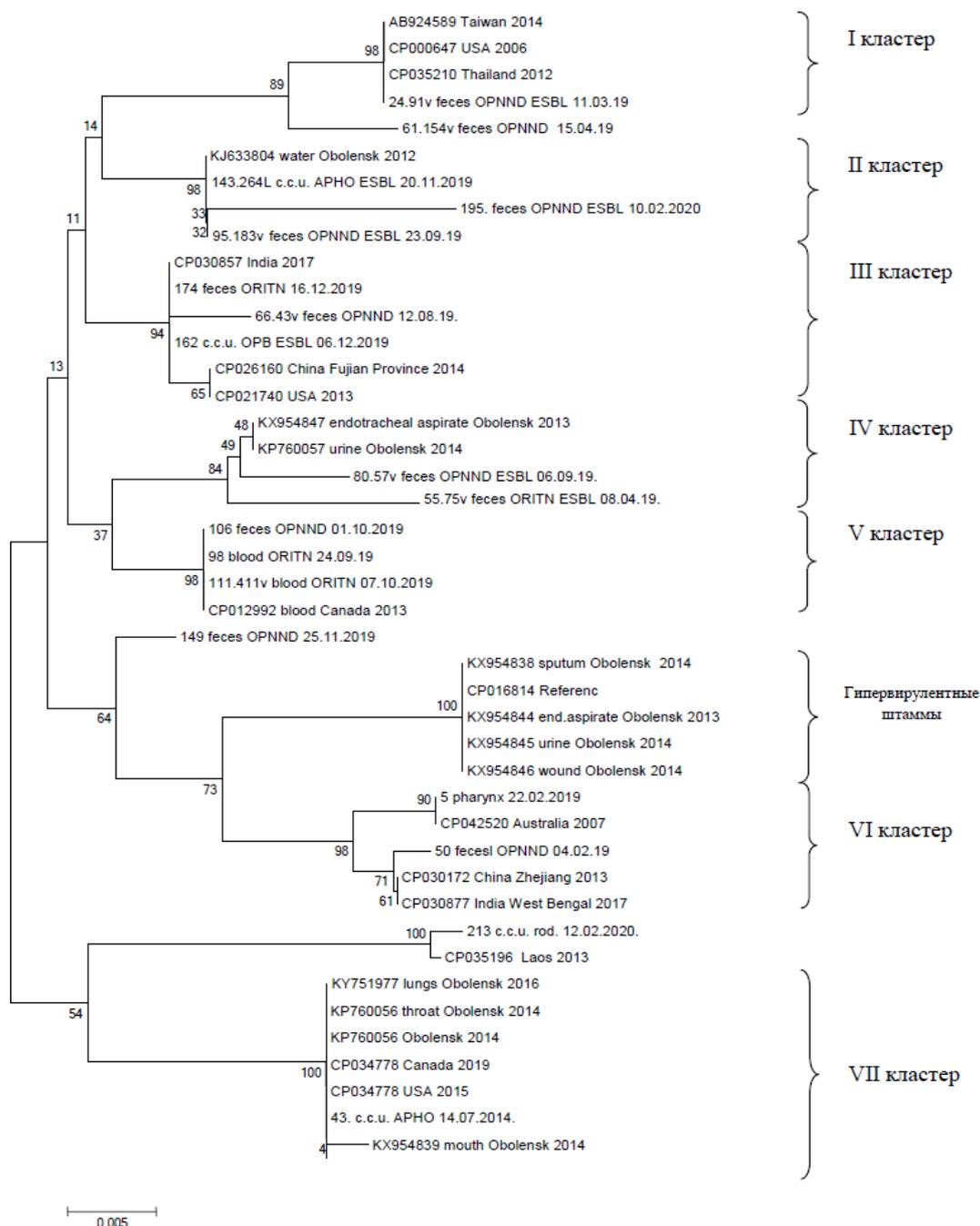


Рис. 1. Филогенетическое дерево штаммов *Klebsiella pneumoniae*, построенное при анализе нуклеотидных последовательностей гена *uge* (435 н.т.).

Fig. 1. Phylogenetic tree for nucleotide sequences of *uge* gene of *Klebsiella pneumoniae* strains (435 n.t.).

недоношенных детей (ОПННД) в сентябре 2019 г. и феврале 2020 г., один штамм, полученный при исследовании пробы из цервикального канала от пациентки акушерско-физиологического отделения (ноябрь 2019 г.) после родоразрешения способом кесарева сечения. Следует отметить, что все штаммы, по данным бактериологического анализа, продуцировали бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС). Наиболее генетически близкий штамм был выделен в Оболенске в 2012 г. (KJ633804).

Третий кластер включал в себя последовательности гена *uge* *K. pneumoniae*, выделенные из проб кала двух недоношенных детей и проб из цервикального канала (декабрь 2019 г.). Один ребенок со сроком гестации 31 нед в возрасте 5 сут находился в отделении реанимации и интенсивной терапии новорожденных (ОРИТН) (декабрь 2019 г.). Другой пациент в возрасте 11 сут сроком гестации 36 нед был госпитализирован в ОПННД (август 2019 г.). Генетически близкие штаммы обнаружены в Индии (2017 г. — CP030857), Китае (2014 г. — CP026160) и США (2014 г. — CP021740).

Четвертый кластер представлен БЛРС-продуцирующими штаммами, выделенными из проб кала недоношенных детей из ОРИТН (апрель 2019 г.) и ОПННД (сентябрь 2019 г.). В него же вошли изоляты, выделенные из эндотрахеального аспирата в 2013 г. (KX954847) и пробы мочи в 2014 г. (KR760057) в Оболенске.

В пятый кластер сгруппировались 3 штамма, выделенные от 2 детей из тройни. Два из них получены из гемокультуры одного ребёнка в возрасте 41 и 63 сут. При этом отсутствие микробного роста в крови в 1-е сутки жизни может свидетельствовать об исключении внутриутробного сепсиса. Другой штамм изолирован из кала второго ребёнка. Третий ребенок из тройни также выделял с калом *K. pneumoniae*, однако детектировать ген *uge* в нем не удалось. Установлена идентичность между штаммами, выделенными из крови одного ребёнка и из кала другого ребёнка. При этом в штамме, выделенном из пробы кала ребёнка с положительной гемокультурой, ген *uge* не обнаружен. На основании полученных результатов исследования можно с высокой долей вероятности предполагать экзогенную инфекцию кровотока, а не транзитоз бактерий через стенку кишечника недоношенного новорождённого (эндогенную инфекцию). Следует также отметить, что наиболее генетически близкий штамм, найденный BLAST, также был получен из гемокультуры в 2013 г. в Канаде (CP012992). Полученные результаты свидетельствуют о возможном присутствии в разных локусах макроорганизма бактерий одного вида с отличающимся набором генов. Молекулярно-генетический мониторинг, направленный на выявление циркуляции штаммов с определенными генетическими детерминантами виру-

лентности, способствует обнаружению источника инфицирования.

Два штамма *K. pneumoniae*, один из которых выделен из пробы зева женщины 33 лет, планирующей беременность, а другой — из кала новорождённого в возрасте 8 сут, вместе с изолятами, зарегистрированными в Австралии в 2007 г. (CP042520), Китае в 2013 г. (CP030172) и Индии в 2017 г. (CP030877), образовали шестой кластер.

Седьмой кластер представлен штаммом, выделенным из пробы цервикального канала беременной женщины в возрасте 26 лет со сроком гестации 30 нед. Наиболее генетически близкие штаммы были выделены в Оболенске в 2014 г. (KX954839), в США в 2015 г. (CP034778) и в Канаде в 2019 г. (CP034778).

Следует отметить, что все выделенные в настоящем исследовании штаммы генетически отличались от гипервирулентных, описанных в исследовании А.И. Лев и группирующихся отдельным кластером [16].

Из 14 штаммов, имеющих ген *fim*, в 4 случаях нуклеотидные последовательности были успешно секвенированы. Филогенетический анализ показал, что все штаммы распределились по 4 кластерам (рис. 2).

В первый кластер вошел штамм 5, выделенный в феврале 2019 г. из зева женщины, планирующей беременность. Он группировался вместе с гипервирулентным штаммом CP034778, обладающим плазмидой вирулентности, выявленным в Канаде в 2018 г. в пробе фекалий пациента в возрасте старше 90 лет [19].

Во втором кластере сгруппировались штаммы, выделенные из цервикального канала в ноябре 2019 г., пробы крови пациентов в Великобритании в 2018 г. (CP034200) и Индии в 2017 г. (CP036327).

В третий кластер распределились штаммы, выделенные из отделяемого шва пациентки послеродового отделения в январе 2020 г., крови в Китае в 2017 г. (CP050275, CP050280) и пробы мочи в Чехии в 2018 г. (CP050371).

Штаммы, выделенные из цервикального канала в феврале 2020 г. в послеродовом отделении, в Китае в 2013 г. (CP026017), из мокроты в Непале в 2018 г. (AP021880), в Чехии в 2018 г. из пробы фекалий (CP050360), образовали четвертый кластер.

Из 65 штаммов 17 продуцировали БЛРС. Устойчивых к карбапенемам и аминогликозидам бактерий не выявлено. Для описания связи между геновариантами *uge*⁺/*fim*⁻, *uge*⁺/*fim*⁺, *uge*⁻/*fim*⁻, *uge*⁻/*fim*⁺ и антибиотикорезистентностью строили таблицы сопряженности и рассчитывали критерии χ^2 и V Крамера (поскольку оценивали более одной градации переменных). Статистический анализ показал, что $\chi^2 = 3,641$; V Крамера = 0,237; $p = 0,303$, что свидетельствует об отсутствии связи между выявленными геновариантами штаммов и антибиотико-

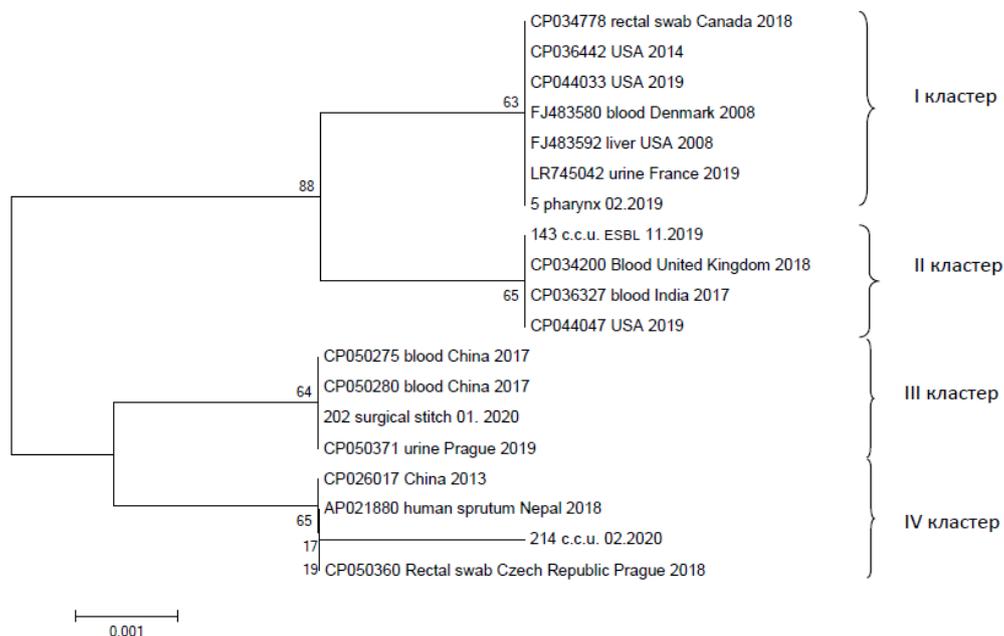


Рис. 2. Филогенетическое дерево штаммов *Klebsiella pneumoniae*, построенное при анализе нуклеотидных последовательностей гена *fim* (460 н.т.).

Fig. 2. Phylogenetic tree for nucleotide sequences of *fim* gene of *Klebsiella pneumoniae* strains (460 n.t.).

резистентностью за счёт БЛРС. Таким образом, с высокой долей вероятности можно утверждать, что гены *ige* и *fim* не обеспечивают молекулярные механизмы устойчивости к бета-лактамам антибиотикам.

Проведенный генетический анализ показал, что все штаммы в изучаемой популяции *K. pneumoniae* можно разделить на 4 группы:

- 1) штаммы, не имеющие генов *ige* и *fim* ($n = 27$);
- 2) изоляты, в которых детектирован ген *ige* ($n = 23$);
- 3) штаммы с геном *fim* ($n = 3$);
- 4) бактерии, содержащие оба гена ($n = 12$).

Таким образом, с целью дифференциации бактерий внутри каждой группы необходимы дополнительные методы исследования.

Обсуждение

Для оценки внутривидового разнообразия бактерий может быть использован метод мультилокусного сиквенса-типирования, при котором анализируют нуклеотидные последовательности 7 генов «домашнего хозяйства», присутствующих у всех штаммов *K. pneumoniae*, и выявляют клональные комплексы эпидемических генетических линий [20]. Однако указанный метод не позволяет анализировать гены факторов вирулентности. Использование для оценки степени родства детекции и анализа генетических детерминант вирулентности позволит не только определить субтипологию штаммов, но и оценить их патогенный потенциал.

Учитывая, что ген *ige* среди изучаемой популяции *K. pneumoniae* встречается чаще, чем *fim*, он может быть выбран для индикации и проведения молекулярно-генетического мониторинга, направленного на предупреждение распространения в стационаре бактерий, обладающих патогенным потенциалом, и профилактику инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи.

Результаты филогенетического анализа последовательностей генов *ige* и *fim* демонстрируют гетерогенность изучаемой популяции штаммов *K. pneumoniae*, что подтверждено широкой географией и временем выявления наиболее генетически близких бактериальных изолятов. Отсутствие четкой кластеризации по временному и территориальному признаку, возрасту пациента и биологическому материалу исключает наличие общих молекулярно-генетических признаков, объединяющих группу штаммов из изучаемой популяции, отвечающих за тропность бактерий к определенным тканям человеческого организма. В то же время монофилитическое происхождение гипервирулентных штаммов, напротив, может указывать на мутации в гене *ige*, определяющие более выраженные вирулентные свойства. Следовательно, детекция вышеуказанного гена предоставляет ценную дополнительную информацию для клинических суждений и является перспективным направлением для дальнейших исследований.

Отсутствие одновременного выявления на протяжении длительного времени штаммов одного субварианта свидетельствует, с одной стороны,

о проведении эффективных противоэпидемических мероприятий, препятствующих длительной циркуляции штаммов среди пациентов стационара, с другой — о возможном существовании разных источников инфицирования.

Также необходимо отметить, что в международной базе генетической информации содержится недостаточное количество задепонированных нуклеотидных последовательностей изучаемых генов для оценки генетического родства штаммов *K. pneumoniae*, выделенных на территории России. Для выявления региональных особенностей циркуляции штаммов необходимо создание локальных баз данных. Использование таких подходов к определению идентичности и сравнению нуклеотидных последовательностей генов факторов вирулентности позволит разработать алгоритм проведения молекулярно-генетического мониторинга за циркуляцией штаммов в лечебном учреждении и оценки распространенности бактерий, обладающих разным патогенным потенциалом.

ЛИТЕРАТУРА

- Lu B., Lin C., Liu H., Zhang X., Tian Y., Huang Y., et al. Molecular characteristics of *Klebsiella pneumoniae* isolates from outpatients in sentinel hospitals, Beijing, China, 2010-2019. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020; 10: 85. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00085>
- Mukherjee S., Bhattacharjee A., Naha S., Majumdar T., Debbarma S.K., Kaur H., et al. Molecular characterization of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST29, ST347, ST1224, and ST2558 causing sepsis in neonates in a tertiary care hospital of North-East India. *Infect. Genet. Evol.* 2019; 69: 166–75. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.01.024>
- Wang B., Pan F., Wang C., Zhao W., Sun Y., Zhang T., et al. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a paediatric hospital in China. *Int. J. Infect. Dis.* 2020; 93: 311–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.02.009>
- Сергеевич В.И., Кудрявцева Л.Г., Пегушина О.Г., Волкова Э.О., Решетникова Н.И. Групповая заболеваемость гнойно-септическими инфекциями клебсиеллезной этиологии пациентов кардиохирургического стационара. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2020; 19(1): 90–8. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2020-19-1-90-98>
- Aslanov B., Lubimova A., Dolgiy A., Pshenichnaya N. Bacteriophages for the control of *Klebsiella* outbreak in the neonatal intensive care unit. *Int. J. Infect. Dis.* 2018; 73(5): 295. (in German)
- Кузьменко С.А., Шамакова М.А., Брусина Е.Б. Факторы риска инфицирования *Klebsiella pneumoniae* пациентов детских медицинских организаций. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2020; 19(2): 40–7. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2020-20-2-40-47>
- Дубоделов Д.В., Любасовская Л.А., Шубина Е.С., Мукошей И.С., Коростин Д.О., Кочеткова Т.О. и др. Генетические детерминанты резистентности к β-лактамам антибиотикам госпитальных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных у новорожденных. *Генетика.* 2016; 52(9): 1097–102. <https://doi.org/10.7868/S0016675816090046>
- Козловских Д.Н., Романов С.В., Диконская О.В. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Свердловской области в 2019 году». Екатеринбург; 2020.

- Shah R.K., Ni Z.H., Sun X.Y., Wang G.Q., Li F. The determination and correlation of various virulence genes, ESBL, serum bactericidal effect and biofilm formation of clinical isolated classical *Klebsiella pneumoniae* and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from respiratory tract infected patients. *Pol. J. Microbiol.* 2017; 66(4): 501–8. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.7042>
- Vargas J.M., Moreno Mochi M.P., Nuñez J.M., Cáceres M., Mochi S., Del Campo Moreno R., et al. Virulence factors and clinical patterns of multiple-clone hypermucoviscous KPC-2 producing *K. pneumoniae*. *Heliyon.* 2019; 5(6): e01829. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01829>
- Izquierdo L., Coderch N., Piqué N., Bedini E., Corsaro M.M., Merino S., et al. The *Klebsiella pneumoniae* wabG gene: role in biosynthesis of the core lipopolysaccharide and virulence. *J. Bacteriol.* 2003; 185(24): 7213–21. <https://doi.org/10.1128/jb.185.24.7213-7221.2003>
- Regué M., Hita B., Piqué N., Izquierdo L., Merino S., Fresno S., et al. A gene, uge, is essential for *Klebsiella pneumoniae* virulence. *Infect. Immun.* 2004; 72(1): 54–61. <https://doi.org/10.1128/iai.72.1.54-61.2004>
- Ikeda M., Mizoguchi M., Oshida Y., Tatsuno K., Saito R., Okazaki M., et al. Clinical and microbiological characteristics and occurrence of *Klebsiella pneumoniae* infection in Japan. *Int. J. Gen. Med.* 2018; 11: 293–9. <https://doi.org/10.2147/ijgm.s166940>
- Zhang S., Zhang X., Wu Q., Zheng X., Dong G., Fang R., et al. Clinical, microbiological, and molecular epidemiological characteristics of *Klebsiella pneumoniae*-induced pyogenic liver abscess in southeastern China. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* 2019; 8: 166. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0615-2>
- Григорова Е.В., Рычкова Л.В., Иванова Е.И., Немченко У.М., Савельяева М.В. Детекция генетических детерминант патогенности у штаммов *Klebsiella* spp., выделенных из кишечного биотопа детей с функциональными гастроинтестинальными расстройствами. *Acta Biomedica Scientifica.* 2018; 3(5): 60–5. <https://doi.org/10.29413/ABS.2018-3.5.9>
- Лев А.И. Молекулярно-генетическая характеристика клинических штаммов *Klebsiella pneumoniae*: вирулентность и устойчивость к антимикробным препаратам: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. 2018; Оболенск.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977; 74(12): 5463–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011; 28(10): 2731–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
- Mataseje L.F., Boyd D.A., Mulvey M.R., Longtin Y. Two hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolates producing a bla KPC-2 carbapenemase from a Canadian patient. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2019; 63(7): e00517-19. <https://doi.org/10.1128/aac.00517-19>
- Diancourt L., Passet V., Verhoef J., Grimont P.A., Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(8): 4178–82. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.8.4178-4182.2005>

REFERENCES

- Lu B., Lin C., Liu H., Zhang X., Tian Y., Huang Y., et al. Molecular characteristics of *Klebsiella pneumoniae* isolates from outpatients in sentinel hospitals, Beijing, China, 2010-2019. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020; 10: 85. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00085>
- Mukherjee S., Bhattacharjee A., Naha S., Majumdar T., Debbarma S.K., Kaur H., et al. Molecular characterization of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST29, ST347, ST1224, and ST2558 causing sepsis in neonates in a tertiary

- care hospital of North-East India. *Infect. Genet. Evol.* 2019; 69: 166–75. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.01.024>
3. Wang B., Pan F., Wang C., Zhao W., Sun Y., Zhang T., et al. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a paediatric hospital in China. *Int. J. Infect. Dis.* 2020; 93: 311–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.02.009>
 4. Sergevnin V.I., Kudryavtseva L.G., Pegushina O.G., Volkova E.O., Reshetnikova N.I. Group incidence by purulent-septic infections of clebsiellous etiology in cardiosurgical patients. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika.* 2020; 19(1): 90–8. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2020-19-1-90-98> (in Russian)
 5. Aslanov B., Lubimova A., Dolgiy A., Pshenichnaya N. Bacteriophages for the control of *Klebsiella* outbreak in the neonatal intensive care unit. *Int. J. Infect. Dis.* 2018; 73(5): 295. (in German)
 6. Kuz'menko S.A., Shmakova M.A., Brusina E.B. Risk factors of *Klebsiella pneumoniae* infections in pediatric healthcare settings. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika.* 2020; 19(2): 40–7. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2020-20-2-40-47> (in Russian)
 7. Dubodelov D.V., Lyubasovskaya L.A., Shubina E.S., Mukosey I.S., Korostin D.O., Kochetkova T.O., et al. Genetic determinants of resistance of hospital-associated strains of *Klebsiella pneumoniae* to β -lactam antibiotics isolated in neonates. *Genetika.* 2016; 52(9): 993–8. <https://doi.org/10.1134/S1022795416090040>
 8. Kozlovskikh D.N., Romanov S.V., Dikonskaya O.V. State report «On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Sverdlovsk region in 2019». Ekaterinburg; 2020. (in Russian)
 9. Shah R.K., Ni Z.H., Sun X.Y., Wang G.Q., Li F. The determination and correlation of various virulence genes, ESBL, serum bactericidal effect and biofilm formation of clinical isolated classical *Klebsiella pneumoniae* and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from respiratory tract infected patients. *Pol. J. Microbiol.* 2017; 66(4): 501–8. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.7042>
 10. Vargas J.M., Moreno Mochi M.P., Nuñez J.M., Cáceres M., Mochi S., Del Campo Moreno R., et al. Virulence factors and clinical patterns of multiple-clone hypermucoviscous KPC-2 producing *K. pneumoniae*. *Heliyon.* 2019; 5(6): e01829. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01829>
 11. Izquierdo L., Coderch N., Piqué N., Bedini E., Corsaro M.M., Merino S., et al. The *Klebsiella pneumoniae* wabG gene: role in biosynthesis of the core lipopolysaccharide and virulence. *J. Bacteriol.* 2003; 185(24): 7213–21. <https://doi.org/10.1128/jb.185.24.7213-7221.2003>
 12. Regué M., Hita B., Piqué N., Izquierdo L., Merino S., Fresno S., et al. A gene, *uge*, is essential for *Klebsiella pneumoniae* virulence. *Infect. Immun.* 2004; 72(1): 54–61. <https://doi.org/10.1128/iai.72.1.54-61.2004>
 13. Ikeda M., Mizoguchi M., Oshida Y., Tatsuno K., Saito R., Okazaki M., et al. Clinical and microbiological characteristics and occurrence of *Klebsiella pneumoniae* infection in Japan. *Int. J. Gen. Med.* 2018; 11: 293–9. <https://doi.org/10.2147/ijgm.s166940>
 14. Zhang S., Zhang X., Wu Q., Zheng X., Dong G., Fang R., et al. Clinical, microbiological, and molecular epidemiological characteristics of *Klebsiella pneumoniae*-induced pyogenic liver abscess in southeastern China. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* 2019; 8: 166. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0615-2>
 15. Grigorova E.V., Rychkova L.V., Ivanova E.I., Nemchenko U.M., Savel'kaeva M.V. Detection of genetic determinants of pathogenicity of strains of *Klebsiella* spp. isolated from the intestinal biotope of children with functional gastrointestinal disorders. *Acta Biomedica Scientifica.* 2018; 3(5): 60–5. <https://doi.org/10.29413/ABS.2018-3.5.9> (in Russian)
 16. Lev A.I. Molecular genetic characteristics of clinical strains of *Klebsiella pneumoniae*: virulence and antimicrobial resistance: Diss. 2018; Obolensk. (in Russian)
 17. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977; 74(12): 5463–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
 18. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011; 28(10): 2731–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
 19. Mataseje L.F., Boyd D.A., Mulvey M.R., Longtin Y. Two hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolates producing a bla KPC-2 carbapenemase from a Canadian patient. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2019; 63(7): e00517-19. <https://doi.org/10.1128/aac.00517-19>
 20. Diancourt L., Passet V., Verhoef J., Grimont P.A., Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(8): 4178–82. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.8.4178-4182.2005>

Информация об авторах

Устюжанин Александр Владимирович[✉] — к.м.н., с.н.с. научного отделения иммунологии, микробиологии, патоморфологии и цитодиагностики ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества», 620028, Екатеринбург, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8521-7652>.
E-mail: ust103@yandex.ru

Чистякова Гузель Нуховна — д.м.н., проф., рук. научного отделения иммунологии, микробиологии, патоморфологии и цитодиагностики ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества», 620028, Екатеринбург, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0852-6766>.

Ремизова Ирина Ивановна — к.б.н., с.н.с. научного отделения иммунологии, микробиологии, патоморфологии и цитодиагностики ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества», 620028, Екатеринбург, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4238-4642>.

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Information about the authors

Aleksander V. Ustyuzhanin[✉] — Ph.D. (Med.), senior researcher, Scientific department of immunology, microbiology, pathomorphology and cytodiagnosics, Ural Scientific Research Institute of Maternity and Child Care, 620028, Yekaterinburg, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8521-7652>.
E-mail: ust103@yandex.ru

Guzel' N. Chistyakova — D. Sci. (Med.), Prof., Head, Scientific department of immunology, microbiology, pathomorphology and cytodiagnosics, Ural Scientific Research Institute of Maternity and Child Care, 620028, Yekaterinburg, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0852-6766>.

Irina I. Remizova — Ph.D. (Biol.), senior researcher, Scientific department of immunology, microbiology, pathomorphology and cytodiagnosics, Ural Scientific Research Institute of Maternity and Child Care, 620028, Yekaterinburg, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4238-4642>.

Contribution: the authors contributed equally to this article.



Изучение роли иммунитета к нейраминидазе вируса гриппа в защите от вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной *S. aureus* после гриппозной инфекции у мышей

Ленева И.А.[✉], Фалынскова И.Н., Карташова Н.П., Глубокова Е.А., Поддубиков А.В., Свитич О.А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, Москва, Россия

Введение. Пневмония является наиболее частым осложнением после гриппозной инфекции, с которым ассоциированы тяжелые случаи заболеваний и смертельные исходы во время сезонных и пандемических вспышек гриппа. Ранее мы показали, что вакцинирование мышей вирусоподобными частицами (ВПЧ), несущими гемагглютинин (НА) вируса гриппа, снижает смертность, вызванную бактериальными инфекциями после перенесенной гриппозной инфекции у мышей.

Цель данной работы — изучение возможности усиления защитного эффекта ВПЧ при дополнении их нейраминидазой (НА) вируса гриппа.

Материалы и методы. Изучали влияние Gag-ВПЧ, несущих НА или NA вируса гриппа А/Пуэрто-Рико/8/34, отдельно или в комбинации на модели вторичной бактериальной инфекции, индуцированной *S. aureus* после гриппозной инфекции гомологичным или гетерологичным вакцине вирусами гриппа.

Результаты. Коктейль НА-Gag-ВПЧ 100 нг + NA-Gag-ВПЧ 20 нг полностью предотвращал смертность, потерю веса и репликацию вируса, а также значительно снижал размножение бактерий в легких животных, зараженных гомологичным вирусом гриппа. Иммунизация этим же коктейлем защищала 60% животных от смертности, снижала потерю их веса и ингибировала размножение патогенов в легких животных с вторичной бактериальной инфекцией *S. aureus* после гриппозной инфекции гетерологичным вирусом гриппа H1N1, несмотря на отсутствие антител, ингибирующих НА и NA этого вируса.

Заключение. Наши результаты показывают, что парентеральная вакцинация ВПЧ, содержащими НА и NA, может улучшить исход вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной *S. aureus* после гриппа, даже если вирус антигенно отличается от вакцинного штамма. При этом в нашей модели иммунитет к НА вируса гриппа имел превалирующее значение.

Ключевые слова: вирус гриппа; *Staphylococcus aureus*; вирусоподобные частицы; вторичные бактериальные пневмонии после гриппозной инфекции.

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 18-45-05002 «Вирусоподобные частицы для борьбы с постгриппозными бактериальными инфекциями, 2018–2020 гг.»).

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

Для цитирования: Ленева И.А., Фалынскова И.Н., Карташова Н.П., Глубокова Е.А., Поддубиков А.В., Свитич О.А. Изучение роли иммунитета к нейраминидазе вируса гриппа в защите от вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной *S. aureus* после гриппозной инфекции у мышей. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(6): 564–577.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-6-7>

Поступила 02.11.2020

Принята в печать 21.12.2020

The study of neuraminidase immunity in protection against secondary bacterial pneumonia induced by *S. aureus* after influenza infection in mice

Irina A. Leneva[✉], Irina N. Falynskova, Nadezhda P. Kartashova, Ekaterina A. Glubokova, Aleksandr V. Poddubikov, Oksana A. Svitich

I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia

Introduction. Pneumonia often occurs secondary to influenza infection and accounts for a large proportion of the morbidity and mortality associated with seasonal and pandemic influenza outbreaks. We previously have shown that vaccination with Virus-like particles (VLPs) containing hemagglutinin (HA) of influenza virus reduces mortality

caused by bacterial infections after an influenza infections in mice. The **aim** of this work is to study whether this protective effect may be potentiated by supplementing the HA preparation with the influenza neuraminidase (NA). **Materials and methods.** We studied the effect of Gag-VLPs with the influenza HA or NA from A/PR/8/34 alone or in combination, in a lethal BALB/c mouse model of *S. aureus* infection after vaccine-matched or mismatched influenza virus challenge.

Results. A cocktail of HA-Gag and NA-Gag-VLPs fully protected from weight loss, mortality and viral replication and significantly reduced the bacterial burden in the lungs of A/PR/8/34 infected animals. Immunization with this cocktail HA-Gag-VLPs 100 ng + NA-Gag-VLPs 20 ng also protected 60% of animals from mortality associated with secondary bacterial *S. aureus* infection following a heterologous H1N1 influenza virus challenge, and led to the significant protection from weight loss and pulmonary pathogen replication even in the absence of HA-inhibition and NA-inhibition antibodies.

Conclusion. Our results indicate that influenza vaccination may improve the outcome of a secondary bacterial pneumonia induced by *S. aureus* after influenza even when the virus is antigenically different from the vaccine strain. At the same time, in our model, the significance of the immunity to influenza virus HA was prevalent.

Keywords: *influenza virus; Staphylococcus aureus; VLP; secondary bacterial pneumonia after influenza infection.*

Acknowledgments. This work was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 18-45-05002 «Virus-like particles for the fight against post-influenza bacterial infections, 2018–2020»).

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

For citation: Leneva I.A., Falynskova I.N., Kartashova N.P., Glubokova E.A., Poddubikov A.V., Svitich O.A. The study of neuraminidase immunity in protection against secondary bacterial pneumonia induced by *S. aureus* after influenza infection in mice. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(6): 564–577. (In Russ.).
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-6-7>

Received 2 November 2020

Accepted 21 December 2020

Введение

Большая часть смертельных исходов от гриппа обусловлена вторичными бактериальными осложнениями, среди которых ведущую роль занимают пневмонии. Смертность от вторичных пневмоний после гриппа ассоциирована с определенной группой бактерий, включающей *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pyogenes* [1–3]. Случаи развития постгриппозных бактериальных пневмоний особенно часто встречаются во время гриппозных пандемий [4], когда у большинства людей отсутствует иммунитет к новому штамму вируса гриппа (ВГ). Известно, что бактериальная суперинфекция, этиологическим агентом которой в большинстве случаев являлся *S. pneumoniae*, была основной причиной смертности во время пандемии «испанского гриппа» в 1918–1919 гг. Однако в пандемии 1957 и 1968 гг. преобладающим этиологическим агентом вторичных бактериальных пневмоний уже являлся *S. aureus* [5]. Также во время пандемии 2009 г. в США было показано, что 77 смертей в период с мая по август 2009 г. сопровождалась бактериальными инфекциями почти в 30% случаев, 46% из которых были вызваны *S. pneumoniae*, 9% — *S. aureus* и 1% — *H. influenzae*. G. Palacios и соавт. (2009) исследовали образцы носоглоточных мазков почти у 200 больных пандемическим гриппом: *H. influenzae* была найдена в 52% образцов, *S. pneumoniae* — в 31%, *S. aureus* — в 18% [6]. В исследовании на контингенте 838 больных детей с тяжелым течением инфекции в США было показано, что в течение 72 ч после попадания в отделение интенсивной

терапии у 33% детей развивалась бактериальная суперинфекция, в 26% случаев вызванная *S. aureus*, в 5,5% — *S. pneumoniae* и в 5% — *H. influenzae* [7]. Бактериемии наблюдались в 5% случаев, главной причиной для них послужил *S. aureus* [7]. Следует подчеркнуть, что почти половина *S. aureus* были представлены формами, резистентными к метициллину. В отношении *S. aureus* процесс создания вакцины далек от завершения [8], кроме того, все более широкое распространение мультирезистентных штаммов стафилококка делает применение антибиотиков неэффективным [9, 10].

Вторичная бактериальная инфекция провоцируется гриппозной инфекцией за счет нарушения механизмов антибактериальной защиты организма [11–13]. Показано, что инактивированные гриппозные вакцины являются эффективным средством предотвращения вторичных бактериальных осложнений при условии использования вакцины, специфичной к вирусному штамму и вызывающей образование нейтрализующего антительного ответа [14–16]. Однако постоянный антигенный дрейф циркулирующих ВГ создает повторяющуюся ситуацию несовпадения антигенных свойств вакцины и штаммов вируса, что снижает или нивелирует эффективность сезонных вакцин. Результаты метаанализа клинических исследований на протяжении 47 сезонов показывают эффективность инактивированных гриппозных вакцин у взрослых людей на уровне 54–73% даже в случае антигенного соответствия препарата [17], однако этот показатель резко снижается при антигенном несоответствии вакцины [17] или в случае вакцинации пожилых людей [18, 19].

Многочисленные исследования позволяют предполагать, что ведущую роль в предотвращении развития гриппозной инфекции играют нейтрализующие антитела к гемагглютинуину (НА) вируса гриппа [20]. В случае несовпадения вакцинного штамма с циркулирующим наблюдается отсутствие адекватной защиты от первичной инфекции, что может приводить к незащищенности вакцинированных от бактериальных осложнений [17]. Нами ранее на экспериментальной модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, индуцированной *S. pneumoniae* или *S. aureus* после гриппозной инфекции, показано, что вакцинация вирусоподобными частицами (ВПЧ), несущими НА ВГ, обеспечивает защиту от бактериальных суперинфекций после гриппозной инфекции, инициированной гомологичным, но не гетерологичным ВГ [21, 22].

Целью настоящей работы являлось изучение роли иммунного ответа к белку ВГ — нейраминидазе (НА) в формировании резистентности к вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной *S. aureus* после гриппозной инфекции. Для иммунизации мышей были использованы ВПЧ, несущие НА в качестве самостоятельного антигена, или их комбинация с ВПЧ, экспрессирующими НА ВГ. С целью провокации вторичной бактериальной инфекции использовали ВГ, отличный по антигенным свойствам от вируса, входящего в состав ВПЧ, что имитировало ситуацию несовпадения циркулирующих штаммов с вакцинными, имеющую место в природе.

Материалы и методы

Вирусоподобные частицы

Препараты ВПЧ, образованные комбинацией ретровирусного белка Gag с белками ВГ А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1), полученные с помощью конструирования бакуловирусного вектора, экспрессирующего ВПЧ при заражении клеток насекомых (Tnms42-клетки), были предоставлены М. Klausberger (Department of Biotechnology, University of Natural Resources and Life Sciences, Вена). НА-Gag-ВПЧ содержали НА ВГ А/PR/8/34 (100 нг/0,2 мл), НА-Gag-ВПЧ — НА ВГ А/PR/8/34 (20 нг/0,2 мл), и Gag-ВПЧ («пустышки») не содержали белков ВГ.

Патогены

В опытах использовали ВГ, полученные из музея ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева»: А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1) (далее А/PR/8/34) и реассортант NIBRG-121xp (А/Калифорния/04/2009 (pdm2009 H1N1 2009) × А/PR/8/34 (H1N1) (2 : 6)), содержащий поверхностные белки НА и NA от вируса А/Калифорния/04/2009, а внутренние белки — от А/PR/8/34. Вирусы для заражения выращивали в 9-дневных развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) в течение 48 ч при 37°C. После определения инфекционной активности вирусов путем титро-

вания в РКЭ их использовали для инфицирования животных.

Для бактериального заражения использовали штамм *S. aureus* № 884, выделенный от пациента и полученный из Коллекции НИИВС им. И.И. Мечникова в лиофилизированном состоянии. Для получения живой культуры ампулу в стерильных условиях вскрывали и добавляли 1 мл питательного бульона (ФБУН ГНЦ ПМБ). Суспензию переносили в пробирку объемом 2 мл и инкубировали 4 ч при 37°C. Затем осуществляли посев на скошенный питательный агар (ФБУН ГНЦ ПМБ). Пробирки с культурой инкубировали в течение 18 ч при 37°C, по стандарту мутности определяли содержание бактерий в 1 мл объема и в этот же день использовали для заражения животных.

РКЭ и животные

РКЭ получали из ООО «Майские просторы», Московская область. В исследованиях использовали мышей-самок линии BALB/c массой 12–14 г (ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, Филиал «Андреевка», Московская область). Содержание и манипуляции с животными соответствовали Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных¹.

Определение эффекта вакцинации в модели бактериальной пневмонии после гриппозной инфекции

Мышей рандомизированно распределяли по группам и иммунизировали внутрибрюшинно в объеме 0,2 мл как коктейлем НА-Gag-ВПЧ + НА-Gag-ВПЧ с различным, включая увеличенное, содержанием в нем НА-Gag-ВПЧ, так и каждым компонентом по отдельности (НА-Gag-ВПЧ и НА-Gag-ВПЧ). Коктейли ВПЧ готовили, смешивая два вида частиц непосредственно перед введением. Содержание белков в 0,2 мл препаратов (на одну мышь): НА-Gag-ВПЧ 100 нг, НА-Gag-ВПЧ 20 нг, коктейль НА-Gag-ВПЧ 100 нг + НА-Gag-ВПЧ 0,8 нг, коктейль НА-Gag-ВПЧ 100 нг + НА-Gag-ВПЧ 4 нг, коктейль НА-Gag-ВПЧ 100 нг + НА-Gag-ВПЧ 20 нг. Кроме того, группа животных одновременно с вакцинацией была инфицирована содержащей ВГ А/PR/8/34 аллантоисной жидкостью интраназально под легким наркозом (0,03 мл, 0,5 МЛД₅₀/мл). Животным контрольных групп вместо препаратов ВПЧ вводили по 0,2 мл стерильного 20 мМ НЕРЕС в соответствующие контролю сроки.

На 21-е сутки после иммунизации 3 мыши в каждой из изучаемых групп были гуманно умерщвлены и у них отобраны пробы крови для определения

¹ Приказ Минздрава России от 23.08.2010 № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации».

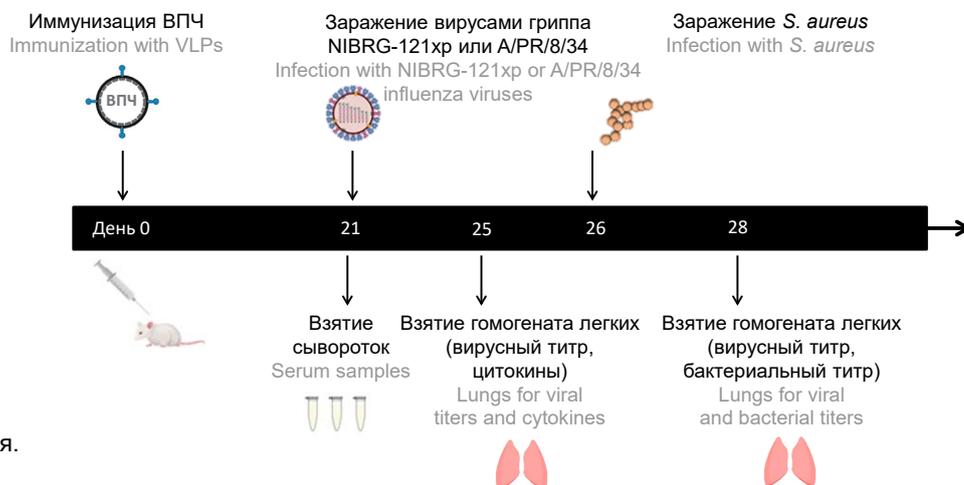


Рис. 1. Дизайн исследования.
Fig. 1. Study design.

антигенной активности в реакции торможения гем-агглютинации (РТГА) и иммуноферментного анализа (ИФА), которые были проведены после подготовки новых полученных сывороток крови. В этот же день мышей инфицировали интраназально под эфирным наркозом соответствующей вирусосодержащей аллантоисной жидкостью (объем 0,03 мл, по 0,5 МЛД₅₀/мл).

На 4-е сутки после заражения 5 животных из каждой группы гуманно умерщвляли, у них забирали легкие для определения инфекционного титра вируса. На 5-е сутки после вирусного заражения оставшихся мышей инфицировали в объеме 0,03 мл интраназально под эфирным наркозом *S. aureus*.

На 8-е и 3-и сутки после вирусного и бактериального заражения соответственно у 5 животных из каждой группы забирали легкие для определения инфекционного титра вируса (путем титрования гомогенатов тканей легких на РКЭ) и бактериальной обсемененности. Наблюдение за животными проводили в течение 21 дня после вирусного заражения (рис. 1). Оценку протективной активности ВПЧ проводили, учитывая защиту ими животных от смертности и потери массы тела. Изменение массы тела рассчитывали отдельно для каждой мыши и выражали в процентах, принимая за 100% массу тела животного перед инфицированием. Для мышей каждой группы определяли среднее значение процента изменения массы тела.

Определение антигенной активности ВПЧ

Для оценки антигенной активности в отношении НА вируса гриппа в сыворотках крови определяли титры сывороточных антиагглютинирующих антител в РТГА с 4 агглютинирующими единицами соответствующего вирусного антигена по стандартной методике².

² WHO manual. URL: <http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/whocdscsrncs20025rev.pdf>

Для обнаружения антител к НА использовали два метода. Первый метод основан на использовании низкомолекулярного субстрата MUNANA. К двукратным разведениям подготовленных сывороток (50 мкл), помещенным в 96-луночные планшеты с плоским дном для измерения флуоресценции («FluoroNunc»), добавляли предварительно определенные рабочие разведения NA-Gag-ВПЧ (50 мкл, 1 : 1024). Далее реакцию проводили, как описано ранее [23]. Кроме того, в сыворотках крови определяли титры вирусспецифических иммуноглобулинов классов А и G при помощи ИФА. В качестве антигенов использовали препарат очищенного рекомбинантного белка НА ВГ А/PR/8/34, содержащий НА в концентрации 1 мг/мл, или препарат очищенного рекомбинантного белка НА ВГ А/PR/8/34, содержащий НА в концентрации 2 мг/мл, сорбированные на 96-луночные планшеты с плоским дном («Thermo Fisher») в течение ночи при 4°C. После отмывки планшетов (3 раза, 300 мкл ФСБ-Tween) были добавлены серийные 1 : 2 разведения изучаемых сывороток (100 мкл), после инкубации в течение 2 ч при комнатной температуре и отмывки планшетов (3 раза, 300 мкл ФСБ-Tween) в каждую лунку планшета помещали 50 мкл меченого пероксидазой конъюгата в разведении 1 : 3000 (#A2304, «Sigma»). После инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре и 3-кратной отмывки планшеты были обработаны 100 мкл субстрата SIGMAFAST™ OPD («Sigma»), реакция была остановлена 25 мкл 3 М H₂SO₄. Оптическую плотность измеряли при λ = 490 нм на спектрофотометре «Tecan Infinite M1000 Microplate Reader» («Tecan»).

Определение инфекционного титра вируса в лёгких мышей

Для определения титра вируса готовили 10-кратные разведения суспензии легких мышей на среде Игла MEM и вводили по 100 мкл каж-

дого разведения в аллантоисную полость 9-дневных РКЭ. Инфицированные РКЭ инкубировали во влажной среде при 37°C в течение 48 ч, затем охлаждали при 4°C в течение 4 ч. Отбирали 50 мкл аллантоисной жидкости, помещали в лунки круглодонного 96-луночного планшета и добавляли 50 мкл 0,5% суспензии куриных эритроцитов. Через 45 мин инкубации по реакции гемагглютинации определяли, в каких РКЭ размножился вирус, и рассчитывали ЭИД₅₀.

Определение обсемененности респираторных путей

Для определения бактериальной обсемененности из полученных образцов гомогенизированных легких готовили серийные разведения и осуществляли прямой высеv на чашки Петри с агаром Мюллера–Хинтона. Учет колониеобразующих единиц (КОЕ) проводили после 18 ч инкубации при 37°C. Количество выросших колоний умножали на степень разведения и коэффициент, обратный количеству посеянного материала, и вырожали в Ig КОЕ/мл.

Результаты

Определение антигенной активности препаратов ВПЧ

При изучении иммунного ответа после однократной иммунизации мышей препаратами НА-Gag-ВПЧ 100 нг, НА-Gag-ВПЧ или их комбинацией, взятыми в различных соотношениях (НА-Gag-ВПЧ 20, 4 или 0,8 нг), в сыворотке крови в РТГА (функциональные антитела) были выявлены различные титры антител к гомологичному вирусу А/PR/8/34 (H1N1). Наивысшие титры обнаруживались в группе мышей, иммунизированных монопрепаратом НА-Gag-ВПЧ. Иммунизация коктейлем с НА-антигеном приводила к снижению титра антигемагглютинирующих антител (табл. 1). В то же время данные ИФА показали близкие по значению показатели IgG-ответа к НА во всех группах. У животных, зараженных сублетальной дозой вируса А/PR/8/34 (H1N1), титры РТГА превосходили показатели в группах, иммунизированных ВПЧ. Ни в одной из экспериментальных групп в РТГА не выявлено антител к гетерологичному штамму NIBRG-121 (H1N1) (табл. 1). Определение иммунного ответа к НА гомологичного вируса А/PR/8/34 (H1N1) путем реакции ингибирования нейраминидазной ферментативной активности с использованием низкомолекулярного субстрата MUNANA не выявило индукцию антител к НА ни в одной из групп, что совпадает с данными исследователей о возможности использования этого субстрата только для выявления моноклональных антител [24]. Использование высокомолекулярного суб-

страта в ELISA позволило выявить в сыворотке крови антитела к НА только у животных, вакцинированных НА-Gag-ВПЧ, а также у животных, зараженных сублетальной дозой вируса А/PR/8/34 (H1N1). При использовании коктейля ВПЧ с НА- и НА-антигенами индукция антител к НА не была выявлена, а увеличение содержания НА-Gag-ВПЧ в коктейле не приводило к обнаружению антител, специфичных к НА, в ферментативном тесте при использовании субстрата ELISA.

Протективная эффективность ВПЧ при индукции инфекции гомологичным и гетерологичным вирусами

Для изучения эффекта ВПЧ, содержащих НА и НА, а также их коктейля с различным, включая увеличенное, содержанием в нем НА-Gag-ВПЧ на модели вторичной бактериальной пневмонии, вызванной *S. aureus*, для индукции гриппозной инфекции было использовано заражение как гомологичным А/PR/8/34, так и гетерологичным NIBRG-121хр ВГ. В группах невакцинированных животных, инфицированных соответствующими вирусами и бактериями (отрицательные контроли, 20 мМ HEPES + NIBRG-121хр + *S. aureus*; 20 мМ HEPES + А/PR/8/34 + *S. aureus*), наблюдалась полная гибель животных при большой потере веса, при этом размножение вируса и бактерий в легких было самым высоким среди всех изученных групп (табл. 2, 3, рис. 2, 3).

При вакцинации Gag-ВПЧ, не содержащими вирусных белков, смертность незначительно отличалась от таковой в группах отрицательного контроля и составляла 80% при инфекции обоими вирусами. Также титры вируса и концентрация бактерий в легких не отличались практически от таковых в группах невакцинированных животных (табл. 2, 3, рис. 2, 3). Общая гибель с большой потерей веса наблюдалась при вакцинации ВПЧ, содержащими только НА А/PR/8/34 (НА-Gag-ВПЧ), при последующем заражении гетерологичным вирусом NIBRG-121хр и бактериальным патогеном. Несмотря на заражение гетерологичным вирусом, вакцинация ВПЧ, содержащими только НА А/PR/8/34 (НА-Gag-ВПЧ), защищала 40% животных от гибели, снижала потерю их веса и размножение вируса и бактерий в легких при последующем заражении *S. aureus*. При инфекции вирусом NIBRG-121хр коктейль ВПЧ с низким содержанием НА (НА-Gag-ВПЧ + НА-Gag-ВПЧ, 0,8 нг) защищал только 30% животных. Увеличение содержания частиц с НА (НА-Gag-ВПЧ + НА-Gag-ВПЧ 20 нг) в коктейле приводило к повышению выживаемости животных до 60%. В этой группе защитный эффект был сравним с таковым у мышей, иммунизированных сублетальной дозой А/PR/8/34 с дальнейшей инфекцией NIBRG-121

Таблица 1. Изучение антигенной активности ВПЧ (вирусоподобных частиц) с HA-Gag-ВПЧ и NA-Gag-ВПЧ, а также коктейля HA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ после вакцинации

Table 1. Study of the antigenic activity of HA-Gag-VLPs and NA-Gag-VLPs, as well as their cocktail (HA-Gag-VLPs + NA-Gag-VLPs) after vaccination

Группа Group	Антитела к HA Antibodies to HA		Антитела к NA Antibodies to NA	
	РТГА reaction of inhibition of hemagglutination	ИФА ELISA	ингибирование активности NA inhibition of neuraminidase activity	ИФА ELISA
HA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ 0.8 нг HA-Gag-VLPs + NA-Gag-VLPs 0.8 ng	< 10, 20, 10, < 10	< 10, < 10, < 20, < 10	< 10, < 10, < 10, < 10	< 10, < 10, < 10, < 10
HA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ 4 нг HA-Gag-VLPs + NA-Gag-VLPs 4 ng	20, < 10, < 10, 10	< 10, < 10, < 10, < 10	< 10, < 10, < 10, < 10	< 10, < 10, < 10, < 10
HA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ 20 нг HA-Gag-VLPs + NA-Gag-VLPs 20 ng	40, 20, 40, 20	< 10, < 10, < 10, < 10	< 10, < 10, < 10, < 10	< 10, < 10, < 10, < 10
HA-Gag-ВПЧ HA-Gag-VLPs	40, 80, 40, 80	< 10, < 20, < 10, < 10	< 10, < 10, < 10, < 10	< 10, < 10, < 10, < 10
NA-Gag-ВПЧ 20 нг NA-Gag-VLPs 20 ng	10, 10, 10, 10	< 10, < 10, < 10, < 10	< 10, < 10, < 10, < 10	40, 20, 40, 40
Сублетальная доза APR/8/34 Sublethal APR/8/34	80, 160, 160, 160	< 10, < 10, 20, < 20	< 10, < 10, < 10, < 10	80, 160, 80, 40
Gag-ВПЧ Gag-VLPs	< 10, < 10, < 10, < 10	< 10, < 10, < 10, < 10	< 10, < 10, < 10, < 10	< 10, < 10, < 10, < 10
20 мМ HEPES (контроль) 20 mM HEPES (control)	< 10, < 10, < 10, < 10	< 10, < 10, < 10, < 10	< 10, < 10, < 10, < 10	< 10, < 10, < 10, < 10

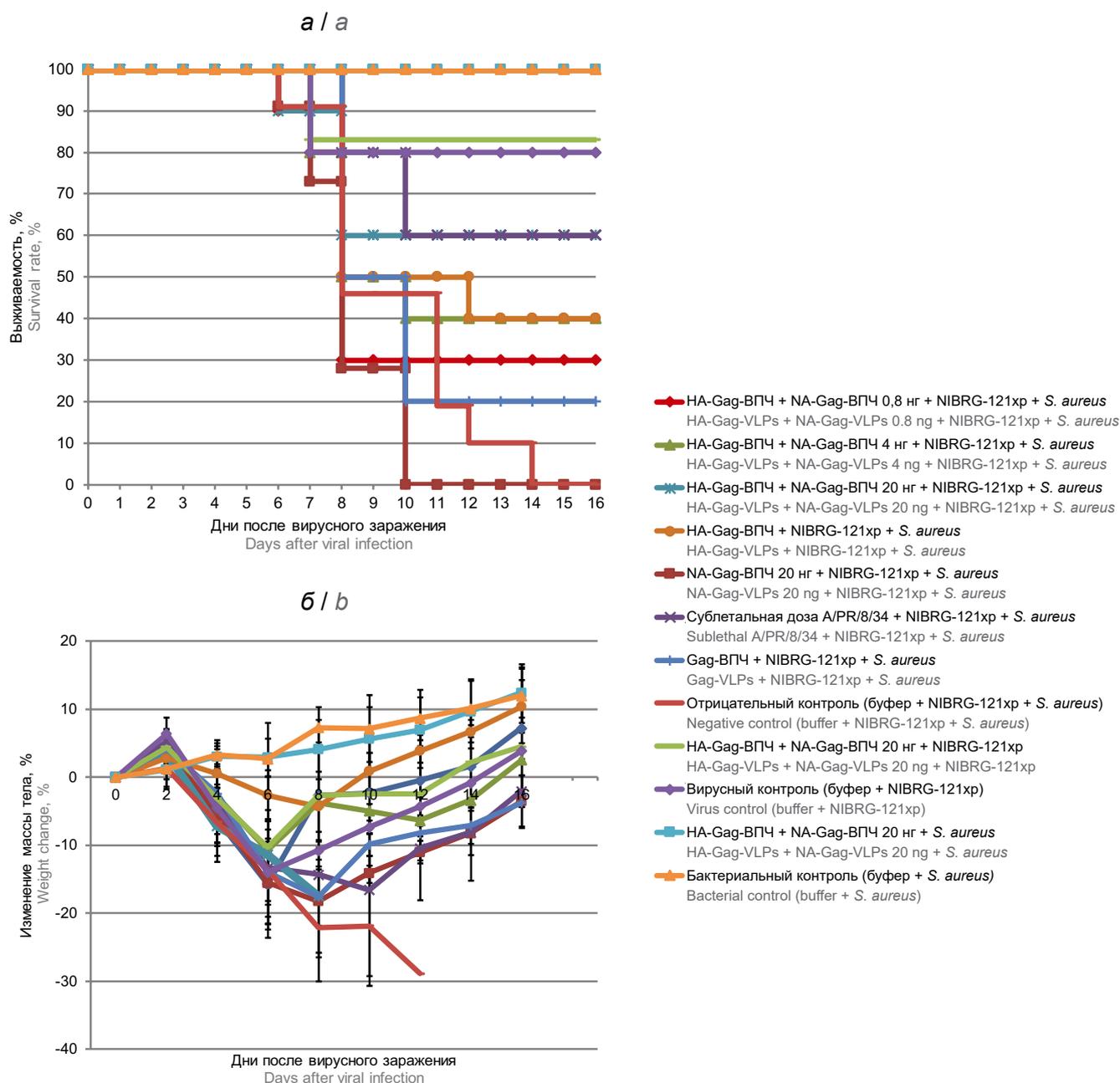


Рис. 2. Влияние вакцинации коктейлем HA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ в разных дозах и каждым компонентом коктейля в отдельности на выживаемость (а) и изменение веса (б) животных на модели вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной *S. aureus*, после гриппозной инфекции гетерологичным NIBRG-121xp (H1N1) ВГ.

Fig. 2. The effect of vaccination with the HA-Gag-VLPs + NA-Gag-VLPs cocktail at different doses and each cocktail component separately on survival (a) and weight change (b) of animals in a model of secondary bacterial pneumonia induced by *S. aureus* after influenza infection with heterologous NIBRG-121xp (H1N1) influenza virus.

с последующим заражением *S. aureus* (табл. 2, рис. 2). В группе положительного контроля после вирусной инфекции при заражении гомологичным вирусом A/PR/8/34 (H1N1) с последующей супер-инфекцией *S. aureus* вакцинирование этим же коктейлем ВПЧ полностью предотвращало гибель мышей, потерю их веса и размножение вируса в легких на 4-е и 7-е сутки (табл. 3, рис. 3).

Исследование интерференового профиля в легких мышей в период перед проведением бактериального заражения

Известно, что выработка интерферонов и активация Th1-лимфоцитов и клеточных компонентов адаптивного иммунитета при вирусной инфекции может способствовать ослаблению ряда механизмов, участвующих в антибактериальном иммунитете.

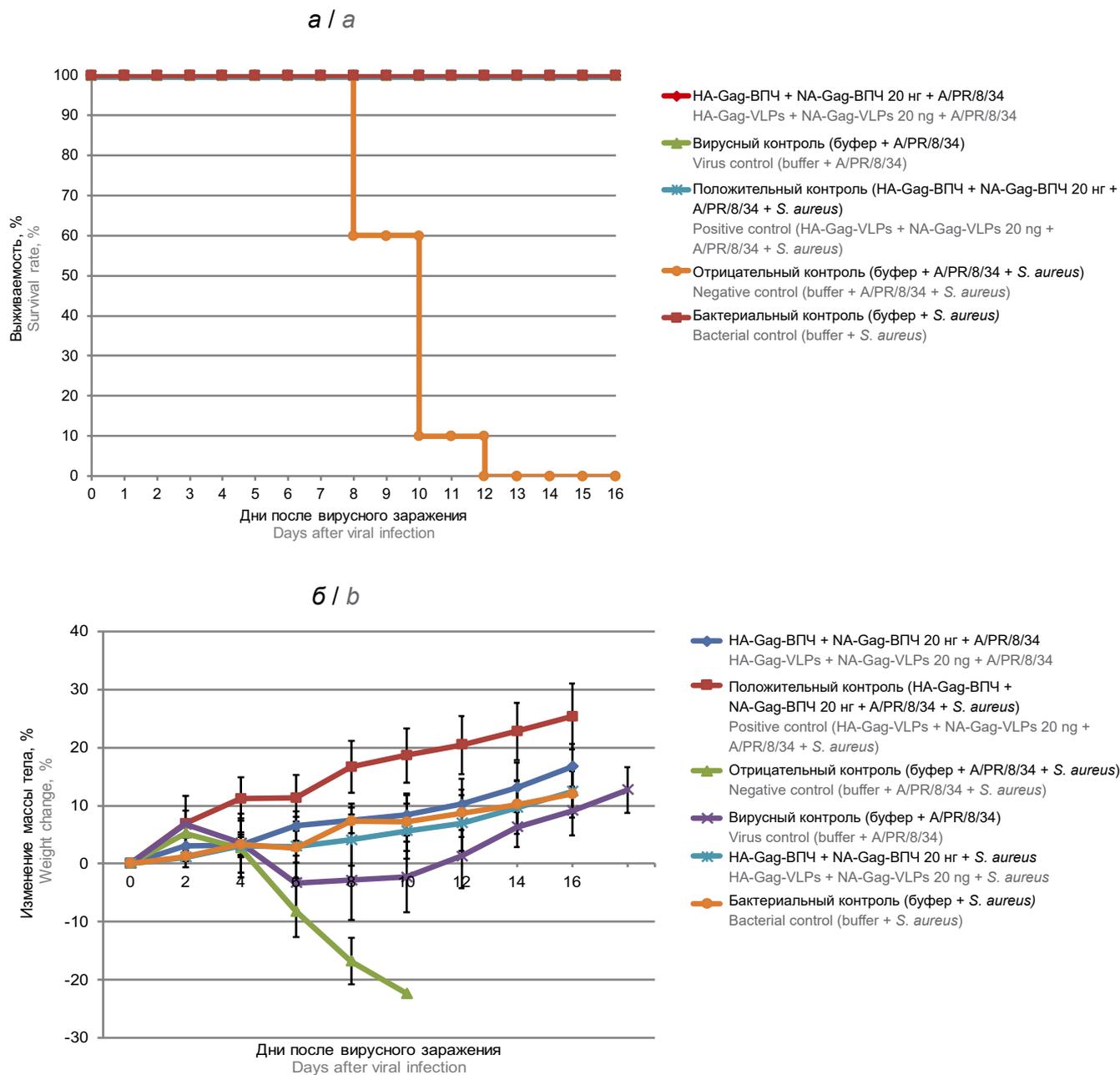


Рис. 3. Влияние вакцинации коктейлем ВПЧ (HA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ) в разных дозах и каждым компонентом коктейля в отдельности на выживаемость (а) и изменение веса (б) животных на модели вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной *S. aureus*, после гриппозной инфекции гомологичным A/PR/8/34 (H1N1) ВГ.

Fig. 3. The effect of vaccination with the HA-Gag-VLPs + NA-Gag-VLPs cocktail at different doses and each cocktail component separately on survival (a) and weight change (b) of animals in a model of secondary bacterial pneumonia induced by *S. aureus* after influenza infection with homologous A/PR/8/34 (H1N1) influenza virus.

те, и являться триггером вторичной бактериальной инфекции. В связи с этим было изучено влияние иммунизации мышей ВПЧ, содержащими HA или NA, а также их комбинациями на выработку интерферонов- α , - β и - γ в легких мышей после вирусного заражения, перед проведением бактериального заражения (рис. 4). В качестве альтернативной группы сравнения были использованы мыши с постинфекционным иммунитетом после заражения субле-

тальной дозой вируса A/PR/8/34. Было показано, что иммунизация препаратом HA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ 20 нг снижает до минимума выработку интерферонов I типа при заражении гомологичным вирусным штаммом, обеспечивая подавление репродукции вируса. В то же время при гетерологичном заражении ни один из вакцинных препаратов достоверно не снижал выработку интерферонов по сравнению с группой неиммунизированных живот-

Таблица 2. Изучение вирусологических частиц с NA-Gag-ВПЧ и NA-Gag-ВПЧ и NA-Gag-ВПЧ, а также их коктейля разного состава на модели вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной *S. aureus*, после гриппозной инфекции гетерологичным вирусом NIBRG-121xp (H1N1)
Table 2. Study of NA-Gag-VLPs, NA-Gag-VLPs, as well as their cocktail of different composition on the model of secondary bacterial pneumonia induced by *S. aureus* after influenza infection with a heterologous virus NIBRG-121xp (H1N1)

Группа Group	Выживаемость Survival		Средняя продолжительность жизни, сут Mean day to death, days	Титр вируса в легких животных, Ig ЭИД _{50,0,1} /мл Lung viral titer, Ig EID _{50,0,1} ml		Плотность бактерий в легких животных, log КОЕ/мл, 7-е сутки после вирусной инфекции Bacterial density, Ig CFU/ml, 7 days after viral infection
	выжившие/общее число survival/total	выживаемость, % survival rate, %		4-е сутки после инфекции day 4 after viral infection	7-е сутки после инфекции day 7 after viral infection	
NA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ 0,8 нг + NIBRG-121xp + <i>S. aureus</i> NA-Gag-VLPs + NA-Gag-VLPs 0.8 ng + NIBRG-121xp + <i>S. aureus</i>	3/10 (<i>p</i> = 0,065169)	30	10,6	5,37 ± 0,47	6,2 ± 0,44	4,66 ± 0,54
NA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ 4 нг + NIBRG-121xp + <i>S. aureus</i> NA-Gag-VLPs + NA-Gag-VLPs 4 ng + NIBRG-121xp + <i>S. aureus</i>	4/10 (<i>p</i> = 0,024770)	40	12,2	5,5 ± 0,58	6,4 ± 1,14	3,46 ± 1,94
NA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ 20 нг + NIBRG-121xp + <i>S. aureus</i> NA-Gag-VLPs + NA-Gag-VLPs 20 ng + NIBRG-121xp + <i>S. aureus</i>	6/10 (<i>p</i> = 0,001735)	60	14,6	4,25 ± 0,5	5 ± 1	1,00 ± 1,41
NA-Gag-ВПЧ + NIBRG-121xp + <i>S. aureus</i> NA-Gag-VLPs + NIBRG-121xp + <i>S. aureus</i>	4/10 (<i>p</i> = 0,024770)	40	12,6	4,75 ± 0,96	7 ± 1	1,84 ± 1,68
NA-Gag-ВПЧ 20 нг + NIBRG-121xp + <i>S. aureus</i> NA-Gag-VLPs 20 ng + NIBRG-121xp + <i>S. aureus</i>	0/11	0	7,1	6,25 ± 0,5	6,2 ± 0,45	4,26 ± 0,68
Сублетальная доза A/PR/8/34 + NIBRG-121xp + <i>S. aureus</i> Sublethal A/PR/8/34 + NIBRG-121xp + <i>S. aureus</i>	6/10 (<i>p</i> = 0,001735)	60	15,2	3 ± 0,82	1,9 ± 0,22	1,94 ± 1,78
Gag-ВПЧ + NIBRG-121xp + <i>S. aureus</i> Gag-VLPs + NIBRG-121xp + <i>S. aureus</i>	2/10 (<i>p</i> = 0,150950)	20	10,2	6,75 ± 0,5	7,6 ± 0,89	5,54 ± 0,96
Отрицательный контроль (буфер + NIBRG-121xp + <i>S. aureus</i>) Negative control (buffer + NIBRG-121xp + <i>S. aureus</i>)	0/11	0	8,5	6,5 ± 0,58	7,8 ± 0,45	5,62 ± 0,53
NA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ 20 нг + NIBRG-121xp NA-Gag-VLPs + NA-Gag-VLPs 20 ng + NIBRG-121xp	5/6 (<i>p</i> = 0,000012)	83	17,6	4,25 ± 0,5	2,8 ± 0,84	—
Вирусный контроль (буфер + NIBRG-121xp) Virus control (buffer + NIBRG-121xp)	4/5 (<i>p</i> = 0,000053)	80	17,2	6,5 ± 0,58	2,6 ± 0,55	—
Бактериальный контроль (буфер + <i>S. aureus</i>) Bacterial control (buffer + <i>S. aureus</i>)	5/5	100	> 16	—	—	1,74 ± 1,24

Примечание. *p* < 0,05 рассматривается как достоверное отличие от контроля.
 Note. *p* < 0.05 is considered as a significant difference from control.

Таблица 3. Изучение вирусоподобных частиц с HA-Gag-ВПЧ и NA-Gag-ВПЧ, а также их коктейля разного состава на модели вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной *S. aureus*, после гриппозной инфекции гомологичным вирусом A/PR/8/34 (H1N1)
Table 3. Study of HA-Gag-VLPs, NA-Gag-VLPs, as well as their cocktail of different composition on the model of secondary bacterial pneumonia induced by *S. aureus* after influenza infection with the homologous virus A/PR/8/34 (H1N1)

Группа Group	Выживаемость Survival		Средняя продолжительность жизни, сут Mean day to death, days	Титр вируса в легких животных, lg ЭИД _{50,0,1} мл Lung viral titer, lg EID _{50,0,1} ml		Плотность бактерий в легких животных, log КОЕ/мл, 7-е сутки после вирусной инфекции Bacterial density, lg CFU/ml, 7 days after viral infection
	выжившие/общее число survival/total	выживаемость, % survival rate, %		4-е сутки после инфекции day 4 after viral infection	7-е сутки после инфекции day 7 after viral infection	
HA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ 20 нг + A/PR/8/34 HA-Gag-VLPs + NA-Gag-VLPs 20 ng + A/PR/8/34	5/5	100	> 16	0	0	—
Вирусный контроль (буфер + A/PR/8/34) Virus control (buffer + A/PR/8/34)	5/5	100	> 16	5,25 ± 0,5	3,0 ± 0,7	—
HA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ 20 нг + <i>S. aureus</i> HA-Gag-VLPs + NA-Gag-VLPs 20 ng + <i>S. aureus</i>	5/5	100	> 16	—	—	1,68 ± 1,56
Бактериальный контроль (буфер + <i>S. aureus</i>) Bacterial control (buffer + <i>S. aureus</i>)	5/5	100	> 16	—	—	1,74 ± 1,24
Положительный контроль (HA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ 20 нг + A/PR/8/34 + <i>S. aureus</i>) Positive control (HA-Gag-VLPs + NA-Gag-VLPs 20 ng + A/PR/8/34 + <i>S. aureus</i>)	5/5	100	> 16	0	0	1,28 ± 1,76
Отрицательный контроль (буфер + A/PR/8/34 + <i>S. aureus</i>) Negative control (buffer + A/PR/8/34 + <i>S. aureus</i>)	0/10	0	8,4	5,25 ± 0,5	7,2 ± 0,84	7,28 ± 1,92

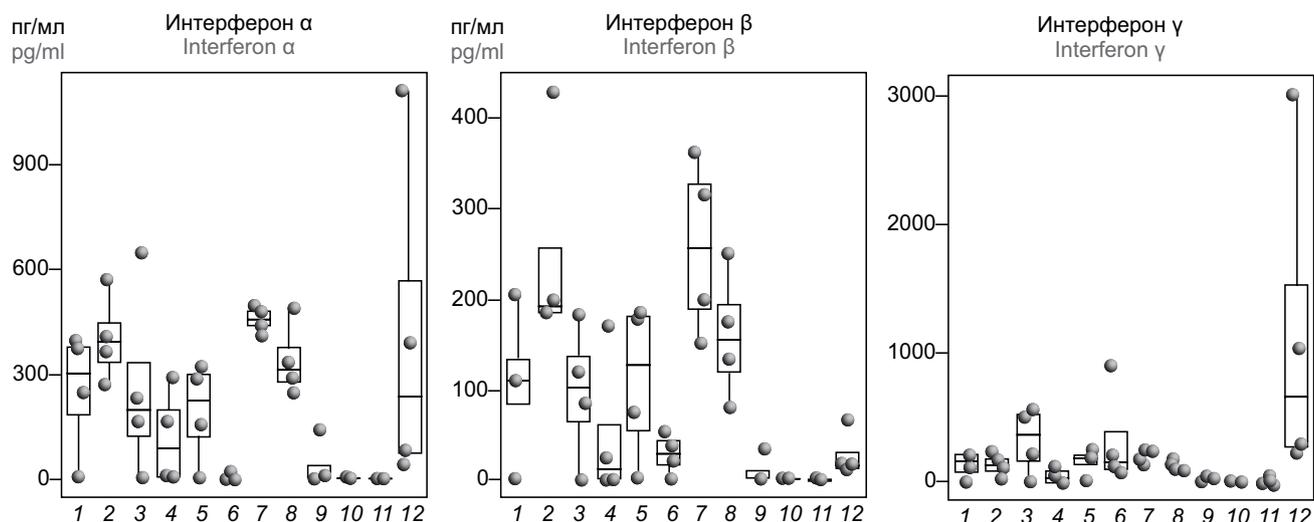


Рис. 4. Влияние вакцинации HA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ в разных дозах и каждым компонентом коктейля в отдельности на индуцированную заражением вирусами гриппа экспрессию интерферонов I/II типов в легких мышей.

1 — HA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ 0,8 нг + NIBRG-121; 2 — HA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ 4 нг + NIBRG-121; 3 — HA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ 20 нг + NIBRG-121; 4 — HA-Gag-ВПЧ + NIBRG-121; 5 — NA-Gag-ВПЧ 20 нг + NIBRG-121; 6 — сублетальная доза A/PR/8/34 + NIBRG-121; 7 — Gag-ВПЧ + NIBRG-121; 8 — буфер + NIBRG-121; 9 — HA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ 20 нг; 10 — HA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ 20 нг + A/PR/8/34; 11 — буфер (неинфицированные мыши); 12 — буфер + A/PR/8/34.

Fig. 4. The effect of vaccination with the HA-VLPs + NA-VLPs cocktail at different doses and each cocktail component separately on interferon (type I/II) expression in the lung of mice infected with influenza viruses.

1 — HA-Gag-VLPs + NA-Gag-VLPs 0.8 ng + NIBRG-121; 2 — HA-Gag-VLPs + NA-Gag-VLPs 4 ng + NIBRG-121; 3 — HA-Gag-VLPs + NA-Gag-VLPs 20 ng + NIBRG-121; 4 — HA-Gag-VLPs + NIBRG-121; 5 — NA-Gag-VLPs 20 ng + NIBRG-121; 6 — sublethal PR8 + NIBRG-121; 7 — Gag-VLPs + NIBRG-121; 8 — Buffer + NIBRG-121; 9 — HA-Gag-VLPs + NA-VLPs 20 ng; 10 — HA-Gag-VLPs + NA-Gag-VLPs 20 ng + A/PR/8/34; 11 — Buffer (uninfected mice); 12 — Buffer + A/PR/8/34.

ных. Единственным исключением являлась группа мышей с перенесённой гриппозной A/PR/8/34-инфекцией. Здесь наблюдалось снижение выработки интерферона- α до минимальных значений на фоне существенного снижения репродукции вируса в легких на 4-е сутки после заражения. Среди препаратов ВПЧ наименьшие показатели выработки интерферонов показал монопрепарат HA-Gag-ВПЧ (рис. 4). Таким образом, добавление нейраминидазного компонента в состав вакцинных препаратов не влияло на выработку интерферонов при заражении иммунизированных мышей гетерологичным штаммом ВГ.

Обсуждение

В настоящее время не существует вакцины для профилактики осложнений, вызванных *S. aureus*. При этом количество штаммов данного возбудителя, невосприимчивых к лечению антибиотиками, постоянно растет. Одной из профилактических стратегий борьбы с бактериальными пневмониями, стафилококковыми инфекциями и связанными с ними патологиями является вакцинация против гриппа. Ранее нами показано, что ВПЧ, несущие HA ВГ, полностью защищают животных от вторичных бактериальных пневмоний, индуцированных *S. aureus*, при условии первичной гриппозной инфекции, вызванной гомологичным вирусом [21]. Показано, что другие белки ВГ вовлечены в летальный синергизм вирус-бактериальных осложнений [25–27].

В частности, NA ВГ способствует бактериальной адсорбции на клетки эпителия путем модификации клеточных поверхностей и увеличения экспрессии рецепторов адгезии [24, 26]. В свете того, что современные противогриппозные вакцины стандартизованы исключительно на основе содержания HA, особый интерес представляла оценка того, как включение в состав ВПЧ, помимо HA, также и NA ВГ будет влиять на антигриппозный иммунитет для снижения вторичных бактериальных осложнений при несовпадении циркулирующих штаммов с вакцинными.

Проведенные эксперименты на модели вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной *S. aureus*, после гриппозной инфекции, вызванной гетерологичным вирусом, показали, что ВПЧ с NA в отдельности не проявляют протективных свойств. Вакцинация коктейлем ВПЧ, содержащим HA и NA, повышала защиту животных от гибели и потери массы тела только при увеличенном содержании NA в коктейле ВПЧ (HA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ 20 нг). Наши результаты совпадали с данными V. Zurli и соавт. [28], которые продемонстрировали значительную защиту от вторичной инфекции *S. aureus* после гетерологичной вирусной инфекции CAL09 при иммунизации субъединичной вакциной, содержащей HA и NA ВГ A/PR/8/34. Совокупность полученных нами результатов позволяет заключить, что иммунный ответ к HA имеет превалирующую

щее значение при защите от вторичной бактериальной суперинфекции, спровоцированной инфекцией гетерологичным по отношению к вакцинному препарату штаммом ВГ. Иммунный ответ только к НА не обеспечивал снижение летальности у животных, однако увеличение концентрации антигена НА в составе двухкомпонентной вакцины с НА способствовало достижению наивысших показателей снижения летальности при гетерологичном вирусном заражении.

Данные по протективной активности ВПЧ, полученные нами, отличались от данных по их антигенной активности. При иммунизации ВПЧ, содержащими коктейль НА и NA, в РТГА выявлено снижение количества антител к НА гомологичного вируса по сравнению с иммунизацией ВПЧ, содержащими только НА. Кроме того, в реакции антинейраминидазной активности мы наблюдали антитела к НА только при иммунизации ВПЧ, содержащими NA. Эти данные дают возможность предполагать, что добавление нейраминидазного компонента в вакцинный препарат может вызывать продукцию антител, интерферирующих с антителами, выявляемыми в реакции РТГА, а наличие анти-НА антител может ингибировать нейтрализующую активность NA-специфичных антител.

В то же время при изучении механизмов защиты и суррогатных маркеров чувствительности к вторичной бактериальной инфекции обнаружено, что показатели повреждения легких, предшествующие бактериальному заражению, лучше коррелируют с протективной активностью, чем титры антител к НА и NA, что, вероятно, обусловлено эффектом их взаимной интерференции, искажающей результаты изучения гуморального ответа к ВПЧ. Обогащение вакцинного препарата NA ведет к частичному улучшению его кросс-протективных свойств, но для достижения лучшего эффекта защиты, по-видимому, требуется включение в состав экспериментальной вакцины более высоких концентраций NA или включение в состав вакцинного препарата других консервативных антигенов ВГ, таких как белки PB1-f2 или NS1, обладающих иммунорегуляторными функциями.

При анализе интерфероновой реакции у вакцинированных мышей при гриппозной инфекции оказалось, что парентеральная иммунизация ВПЧ, экспрессирующими НА и NA, предотвращает выработку интерферонов I и II типов только при условии индукции нейтрализующих антител к гомологичному вирусу, но не оказывает влияния при инфекции гетерологичным вирусом. Влияние иммунизации антигеном NA на снижение концентрации интерферонов I типа в легких при инфекции NIBRG-121хр было недостоверным и не превалировало над эффектом, достигаемым при иммунизации ВПЧ, экспрессирующими

НА. Следует отметить, что индукция интерферонов при инфекции вирусом NIBRG-121хр была существенно ниже по сравнению с вирусом A/PR/8/34 (H1N1).

Важно отметить, что наивысшие титры антител к НА и NA гомологичного вируса и высокий протективный эффект при заражении гетерологичным вирусом наблюдались у мышей с постинфекционным иммунитетом в результате перенесенной инфекции вирулентным штаммом A/PR/8/34 (H1N1). Очевидно, что при отсутствии нейтрализующих антител данный эффект может быть связан с формированием Т-клеточного звена противовирусного иммунитета при естественной гриппозной инфекции. Известно, что респираторная инфекция или иммунизация живыми аттенуированными вакцинами способны формировать резидентные клетки памяти (T_hm), ассоциированные со слизистыми оболочками респираторного тракта, обладающие способностью обеспечивать кросс-протективную защиту в отношении гетерологичных ВГ [29]. Возможность индукции такого иммунитета с помощью ВПЧ при интраназальном введении требует дальнейшего изучения.

Заключение

Иммунный ответ к НА имеет превалирующее значение при защите от вторичной бактериальной суперинфекции, спровоцированной инфекцией гетерологичным по отношению к вакцинному препарату штаммом ВГ, иммунный ответ только к NA не обеспечивает снижение летальности у животных. В то же время обогащение ВПЧ NA приводит к частичному улучшению кросс-протективных свойств вакцинного препарата. По-видимому, для достижения лучшего эффекта защиты требуется включение в состав ВПЧ других, более консервативных антигенов ВГ, таких как PB1-f2- или NS1-белки.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Joseph C., Togawa Y., Shindo N. Bacterial and viral infections associated with influenza. *Influenza Other Respir. Viruses*. 2013; (7 Suppl. 2): 105–13. <https://doi.org/10.1111/irv.12089>.
2. Metersky M.L., Masterton R.G., Lode H., File T.M., Babinchak T. Epidemiology, microbiology, and treatment considerations for bacterial pneumonia complicating influenza. *Int. J. Infect. Dis.* 2012; 16(5): e321–31. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2012.01.003>
3. Metzger D.W., Sun K. Immune dysfunction and bacterial coinfections following influenza. *J. Immunol.* 2013; 191(5): 2047–52. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301152>
4. Morens D.M., Taubenberger J.K., Fauci A.S. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *J. Infect. Dis.* 2008; 198(7): 962–70. <https://doi.org/10.1086/591708>
5. Lindsay M.I., Herrmann E.C., Morrow G.W., Brown A.L. Hong Kong influenza: clinical, microbiologic, and pathologic features in 127 cases. *JAMA.* 1970; 214(10): 1825–32. <https://doi.org/10.1001/jama.1970.03180100019004>
6. Palacios G., Hornig M., Cisterna D., Savji N., Bussetti A.V., Kapoor V., et al. *Streptococcus pneumoniae* coinfection is cor-

- related with the severity of H1N1 pandemic influenza. *PLoS One*. 2009; 4(12): e8540. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008540>
7. Randolph A.G., Vaughn F., Sullivan R., Rubinson L., Thompson B.T., Yoon G., et al. Critically ill children during the 2009–2010 influenza pandemic in the United States. *Pediatrics*. 2011; 128(6): e1450–8. <https://doi.org/10.1542/peds.2011-0774>
 8. Giersing B.K., Dastgheyb S.S., Modjarrad K., Moorthy V. Status of vaccine research and development of vaccines for *Staphylococcus aureus*. *Vaccine*. 2016; 34(26): 2962–6. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.110>
 9. Shapiro A., Raman S., Johnson M., Piehl M. Community-acquired MRSA infections in North Carolina children: prevalence, antibiotic sensitivities, and risk factors. *N. C. Med. J.* 2009; 70(2): 102–7.
 10. Dibah S., Arzanlou M., Jannati E., Shapouri R. Prevalence and antimicrobial resistance pattern of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from clinical specimens in Ardabil, Iran. *Iran. J. Microbiol.* 2014; 6(3): 163–8.
 11. McCullers J.A., Rehg J.E. Lethal synergism between influenza virus and *Streptococcus pneumoniae*: characterization of a mouse model and the role of platelet-activating factor receptor. *J. Infect. Dis.* 2002; 186(3): 341–50. <https://doi.org/10.1086/341462>
 12. Iverson A.R., Boyd K.L., McAuley J.L., Plano L.R., Hart M.E., McCullers J.A. Influenza virus primes mice for pneumonia from *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* 2011; 203(6): 880–8. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiq113>
 13. Mina M.J., Klugman K.P. The role of influenza in the severity and transmission of respiratory bacterial disease. *Lancet Respir. Med.* 2014; 2(9): 750–63. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(14\)70131-6](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(14)70131-6)
 14. Huber V.C., Peltola V., Iverson A.R., McCullers J.A. Contribution of vaccine-induced immunity toward either the HA or the NA component of influenza viruses limits secondary bacterial complications. *J. Virol.* 2010; 84(8): 4105–8. <https://doi.org/10.1128/JVI.02621-09>
 15. Chaussee M.S., Sandbulte H.R., Schuneman M.J., DePaula F.P., Addengast L.A., Schlenker E.H., et al. C. Inactivated and live, attenuated influenza vaccines protect mice against influenza: *Streptococcus pyogenes* super-infections. *Vaccine*. 2011; 29(21): 3773–81. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.03.031>
 16. Okamoto S., Kawabata S., Fujitaka H., Uehira T., Okuno Y., Hamada S. Vaccination with formalin-inactivated influenza vaccine protects mice against lethal influenza *Streptococcus pyogenes* superinfection. *Vaccine*. 2004; 22(21-22): 2887–93. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2003.12.024>
 17. Tricco A.C., Chit A., Soobiah C., Hallett D., Meier G., Chen M.H., et al. Comparing influenza vaccine efficacy against mismatched and matched strains: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med.* 2013; 11: 153. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-153>
 18. Lang P.O., Mendes A., Socquet J., Assir N., Govind S., Aspinall R. Effectiveness of influenza vaccine in aging and older adults: comprehensive analysis of the evidence. *Clin. Interv. Aging*. 2012; 7: 55–64. <https://doi.org/10.2147/CIA.S25215>
 19. Govaert T.M., Thijs C.T., Masurel N., Sprenger M.J., Dinant G.J., Knottnerus J.A. The efficacy of influenza vaccination in elderly individuals. A randomized double-blind placebo-controlled trial. *JAMA*. 1994; 272(21): 1661–5.
 20. Carrat F., Flahault A. Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift. *Vaccine*. 2007; 25(39-40): 6852–62. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.07.027>
 21. Klausberger M., Leneva I.A., Egorov A., Strobl F., Ghorbanpour S.M., Falynskova I.N., et al. Off-target effects of an insect cell-expressed influenza HA-pseudotyped gag-VLP preparation in limiting postinfluenza *Staphylococcus aureus* infections. *Vaccine*. 2019; 38(4): 859–67. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.10.083>
 22. Klausberger M., Leneva I.A., Falynskova I.N., Vasiliev K., Poddubikov A.V., Lindner C., et al. The potential of influenza HA-specific immunity in mitigating lethality of postinfluenza pneumococcal infections. *Vaccines*. 2019; 7(4): 187. <https://doi.org/10.3390/vaccines7040187>
 23. Leneva I.A., Burtseva E.I., Yatsyshina S.B., Fedyakina I.T., Kirillova E.S., Selkova E.P., et al. Virus susceptibility and clinical effectiveness of anti-influenza drugs during the 2010–2011 influenza season in Russia. 2016. *Int. J. Infect. Dis.* 2016; 43: 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.01.001>
 24. WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. Available at: <https://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/whocdscsrncs20025rev.pdf>
 25. McCullers J.A., Bartmess K.C. Role of neuraminidase in lethal synergism between influenza virus and *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* 2003; 187(6): 1000–9. <https://doi.org/10.1086/368163>
 26. Alymova I.V., Samarasinghe A., Vogel P., Green A.M., Weinelich R., McCullers J.A. A novel cytotoxic sequence contributes to influenza A viral protein PB1-F2 pathogenicity and predisposition to secondary bacterial infection. *J. Virol.* 2014; 88(1): 503–15. <https://doi.org/10.1128/JVI.01373-13>
 27. Li N., Ren A., Wang X., Fan X., Zhao Y., Gao G.F., et al. Influenza viral neuraminidase primes bacterial coinfection through TGF- β -mediated expression of host cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015; 112(1): 238–43. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414422112>
 28. Zurli V., Gallotta M., Taccone M., Chiarot E., Brazzoli M., Corrente F., et al. Positive contribution of adjuvanted influenza vaccines to the resolution of bacterial superinfections. *J. Infect. Dis.* 2016; 213(12): 1876. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw048>
 29. Zens K.D., Chen J.K., Farber D.L. Vaccine-generated lung tissue-resident memory T cells provide heterosubtypic protection to influenza infection. *JCI Insight*. 2016; 1(10): e85832. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.85832>

Информация об авторах

Ленева Ирина Анатольевна[✉] — д.б.н., зав. лаб. экспериментальной вирусологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7755-2714>. E-mail: wnyfd385@yandex.ru

Фалынскова Ирина Николаевна — н.с. лаб. экспериментальной вирусологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9836-9620>.

Карташова Надежда Павловна — н.с. лаб. экспериментальной вирусологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2096-5080>.

Information about the authors

Irina A. Leneva[✉] — D. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of experimental virology, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7755-2714>. E-mail: wnyfd385@yandex.ru

Irina N. Falynskova — researcher, Laboratory of experimental virology, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9836-9620>.

Nadezhda P. Kartashova — researcher, Laboratory of experimental virology, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2096-5080>.

Глубокова Екатерина Андреевна — м.н.с. лаб. экспериментальной вирусологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5925-9733>.

Поддубиков Александр Владимирович — к.м.н., зав. лаб. микробиологии условно-патогенных бактерий, ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8962-4765>.

Свитич Оксана Анатольевна — д.м.н., проф., член-корр. РАН, зав. лаб. молекулярной иммунологии, директор ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>.

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Ekaterina A. Glubokova — junior researcher, Laboratory of experimental virology, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5925-9733>.

Aleksandr V. Poddubikov — PhD (Med.), Head, Laboratory of microbiology of opportunistic bacteria, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8962-4765>.

Oksana A. Svitich — D. Sci. (Med.), Prof., Corresponding Member of RAS, Head, Laboratory of molecular immunology, Director, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>.

Contribution: the authors contributed equally to this article.



Протеомный анализ типичных и генетически измененных штаммов *Vibrio cholerae* O1 серогруппы биовара El Tor

Плеханов Н.А.[✉], Заднова С.П., Крицкий А.А., Полунина Т.А., Котова Н.В., Баданин Д.В., Смирнова Н.И.

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб"» Роспотребнадзора, 410005, Саратов, Россия

Цель работы — сравнительное изучение экспрессии белков у типичных и генетически измененных штаммов *Vibrio cholerae* O1 серогруппы биовара El Tor с помощью протеомного анализа.

Материалы и методы. В качестве модельных были использованы клинические штаммы *V. cholerae* — типичный M1062 (Астрахань, 1970) и генетически измененный M1509 (Москва, 2012). Штаммы выращивали в LB бульоне pH 7,2. Получали фракции лизатов клеток и экзопротеинов и анализировали их методом 2D-электрофореза. Различающиеся белковые пятна исследовали масс-спектрометрически. Изучение выживаемости штаммов *V. cholerae* в условиях осмотического и оксидативного стресса проводили при инкубации штаммов в 3 М растворе NaCl или 20 мМ растворе H₂O₂.

Результаты и обсуждение. При анализе лизатов клеток значительных отличий в экспрессии белков с известной функцией между изучаемыми штаммами не обнаружено. Подавляющая часть идентифицированных белков в лизатах функционально связана с углеводным обменом, метаболизмом аминокислот и энергетическими процессами в клетке. В то же время во фракции экзопротеинов геноварианта M1509 присутствовали в повышенных количествах белки (пероксидаза, супероксиддисмутаза, тиоредоксин, белки внешней мембраны OmpW и OmpT), защищающие клетки холерного вибриона от воздействия стрессовых факторов внешней среды. Последующее изучение устойчивости штаммов к осмотическому и оксидативному стрессу выявило лучшую выживаемость геноварианта при действии указанных факторов.

Заключение. Данные протеомного анализа типичного и генетически измененного штаммов *V. cholerae* биовара El Tor свидетельствуют о повышенной экспрессии у геноварианта белков, обеспечивающих устойчивость вибрионов к действию стрессовых факторов внешней среды, что, возможно, является одной из причин их широкого распространения. Кроме того, полученные сведения позволят выявить новые биомаркеры, которые могут быть использованы для дифференциации типичных штаммов и геновариантов *V. cholerae* биовара El Tor.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*; протеомный анализ; белки адаптации; осмотический стресс; оксидативный стресс.

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках НИР 76-4-19 «Комплексный геномно-протеомный анализ варибельности эпидемически значимых свойств *Vibrio cholerae* O1, выделенных на территории Российской Федерации».

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

Для цитирования: Плеханов Н.А., Заднова С.П., Крицкий А.А., Полунина Т.А., Котова Н.В., Баданин Д.В., Смирнова Н.И. Протеомный анализ типичных и генетически измененных штаммов *Vibrio cholerae* O1 серогруппы биовара El Tor. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(6): 578–586.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-6-8>

Поступила 15.04.2020

Принята в печать 26.06.2020

Proteomic analysis of typical and genetically altered strains of *Vibrio cholerae* serogroup O1, biovar El Tor

Nikita A. Plekhanov[✉], Svetlana P. Zadnova, Andrey A. Kritsky, Tatyana A. Polunina, Nina V. Kotova, Daniil V. Badanin, Nina I. Smirnova

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 410005, Saratov, Russia

Objective — comparative study of protein expression in typical and genetically altered *Vibrio cholerae* strains of O1 serogroup, biovar El Tor by means of proteomic analysis.

Materials and methods. Clinical *V. cholerae* strains — typical strain, M106 (Astrakhan, 1970) and genetically altered one, M1509 (Moscow, 2012) — were used as model ones. Strains were cultivated in LB broth (pH7.2).

Then, cell and exoprotein lysate fractions were obtained and investigated in 2D electrophoresis. Different protein stains were examined using mass spectrometry. Survivability of *V. cholerae* strains under osmotic and oxidative stresses was studied during incubation of the strains in 3 M NaCl solution or 20 mM H₂O₂ solution.

Results and discussion. When analyzing cell lysates, significant differences in protein expression with known function between studied strains were not detected. The great majority of identified proteins in the lysates is functionally associated with carbohydrate metabolism, amino acid metabolism, and energy processes in a cell. At the same time, exoprotein fraction of M1509 genovariant contained increased amount of proteins (peroxidase, superoxide dismutase, thioredoxin, outer membrane proteins OmpW, OmpT) protecting the cells of cholera vibrio from effect of stress factors of the environment. Further study of the resistance to osmotic and oxidative stresses revealed better survivability in the genovariant when exposed to the stated factors.

Conclusion. The data of proteomic analysis of the typical and genetically altered *V. cholerae* strains, biovar El Tor, testify to high levels of expression of the proteins that provide for vibrio resistance to the effect of environmental stress factors in genovariants, which is possibly one of the causes of their wide dissemination. In addition, the results obtained will allow for identification of new biomarkers which can be used for differentiation of typical strains and genovariants of *V. cholerae*, biovar El Tor.

Keywords: *Vibrio cholerae*; proteomic analysis; adaptation proteins; osmotic stress; oxidative stress.

Acknowledgments. The work was carried out within the framework of research work 76-4-19 «Complex genomic-proteomic analysis of the variability of epidemically significant properties of *Vibrio cholerae* O1 isolated on the territory of the Russian Federation».

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

For citation: Plekhanov N.A., Zadnova S.P., Kritsky A.A., Polunina T.A., Kotova N.V., Badanin D.V., Smirnova N.I. Proteomic analysis of typical and genetically altered strains of *Vibrio cholerae* serogroup O1, biovar El Tor. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(6): 578–586. (In Russ.).
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-6-8>

Received 15 April 2020
Accepted 26 June 2020

Введение

В настоящее время продолжается 7-я пандемия холеры, которая началась в 1961 г. и была вызвана токсигенными типичными штаммами *Vibrio cholerae* O1 серогруппы биовара El Tor. От штаммов *V. cholerae* O1 классического биовара, которые явились причиной 5-й и 6-й пандемий холеры, типичные вибрионы El Tor отличаются по содержанию и структуре ряда генов патогенности, пандемичности и адаптации. Результатом таких различий явилось изменение у El Tor вибрионов ряда биохимических свойств, снижение уровня вирулентности, но одновременно повышение выживаемости во внешней среде [1, 2].

В начале 1990-х гг. стало известно о возникновении высоковирулентных генетически изменённых штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor или геновариантов, содержащих в опероне *ctxAB*, кодирующем холерный токсин, ген *ctxB* классических вибрионов (аллель *ctxB1*), полученный путем горизонтального переноса генов. В результате геноварианты продуцируют значительно больше холерного токсина по сравнению с типичными вибрионами El Tor, имеющими аллель *ctxB3* [3]. В ходе эволюции возбудителя происходили дальнейшие изменения структуры генома геновариантов и возникали штаммы с новыми свойствами. Так, в 2007 г. в Индии были обнаружены клоны, одной из генетических особенностей которых было наличие в опероне *ctxAB* нового аллеля гена *ctxB* — *ctxB7*. Указанные штаммы получили широкое распространение, приведя к тяжелым эпидемиям в ряде стран

Африки, Латинской Америки и Юго-Восточной Азии, а будучи завезёнными на территорию Российской Федерации, вызвали единичные случаи холеры [4–7]. Впоследствии в геноме таких штаммов возникли новые мутации в ключевых генах вирулентности и пандемичности, наиболее значимые из них — новый аллель гена *tcpA* (*tcpA*^{CRS}), кодирующего основную субъединицу токсин-корегулируемых пилей адгезии, участвующую в колонизации тонкого кишечника, а также делеция ряда генов в острове пандемичности VSP-II.

Несмотря на активно проводимые исследования молекулярно-генетических и фенотипических свойств генетически изменённых штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы биовара El Tor, факторы, способствующие их широкому распространению, до конца не раскрыты. Очевидная высокая вирулентность геновариантов является не единственной причиной их преобладания над типичными изолятами. Высказано предположение, что селективные преимущества геновариантов обусловлены их лучшей адаптацией к изменяющимся условиям окружающей среды [8]. Однако выявление механизмов, обеспечивающих повышенную устойчивость генетически изменённых штаммов *V. cholerae* во внешней среде, невозможно без проведения сравнительной оценки экспрессии генов. В связи с вышеизложенным целью данной работы было сравнительное изучение экспрессии белков у типичных и генетически изменённых штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы биовара El Tor с помощью протеомного анализа.

Материалы и методы

В качестве модельных были использованы два клинических штамма *V. cholerae* O1 серогруппы биовара El Tor: типичный штамм M1062 (Астрахань, 1970; *ctxB3*, *tcpA*^{ElTor}, VSP-II интактный) и геновариант M1509 (Москва, 2012; *ctxB7*, *tcpA*^{CIRS}, VSP-II с делецией), хранящиеся в Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб». Полногеномные последовательности выбранных штаммов были получены ранее (номер доступа в GenBank: M1062 — SSAB00000000.1; M1509 — NEDZ00000000.1).

Штаммы выращивали в LB бульоне (pH 7,2) в течение 16–18 ч при 37°C. Затем бактериальные клетки осаждали с использованием центрифуги MR23i («Thermo Fisher Scientific») при 15 000 об/мин в течение 20 мин, получая осадок клеток и супернатант. К осадку бактерий добавляли лизирующий буфер (7 М мочевины, 2 М тиомочевина, 2% CHAPS, 0,5% Triton X-100, 20 мМ Tris, 2 мМ MgCl₂, 65 мМ дитиотреитол, 1 мМ Na₂-EDTA или 5 мМ фенолметилсульфонил фторид) в соотношении 1 мл на 100 мг клеток. После добавления буфера клетки обрабатывали на ультразвуковом гомогенизаторе «Bioruptor UCD-200» («Diagenode») циклом озвучивания 30 с ON, 30 с OFF в течение 10 мин при частоте 60 кГц на ледяной бане. Образцы оставляли в лизирующем буфере на 2 ч, затем центрифугировали при 13 000 об/мин в течение 10 мин. Экзопротеины получали из супернатанта при добавлении 50% трихлоруксусной кислоты до конечной концентрации 10% с инкубацией на льду в течение 30 мин. Осадок белков дважды промывали холодным ацетоном, высушивали и растворяли в 10 мл холодного 10 мМ Трис-HCl буфера (pH 8,5). Работу с пробами проводили после получения результата об их специфической стерильности¹.

Белковый состав фракций лизатов и экзопротеинов исследовали методом SDS-PAGE-электрофореза [9]. Предварительно устанавливали концентрацию белка в пробах [10]. Для проведения двумерного (2D) электрофореза белков использовали набор для изофокусирования «2-D Starter Kit» («Bio-Rad») и коммерческие IPG-стрипы («Bio-Rad») длиной 17 см с градиентом pH 4–7, широко применяемые для изучения протеома *V. cholerae*. Для визуализации белков электрофореграммы окрашивали кумасси синим G-250. Анализ 2D-гелей проводили с помощью программного обеспечения «Dymension» мультифункциональной системы гель-документирования «Syngene» («G:BOX Chemi XT4»). Изменение экспрессии идентифицированных белков устанавливали по изменению интенсивности белкового пятна на электрофореграмме. Выбранные для ана-

лиза белковые пятна вырезали, обрабатывали трипсином и разделяли на хроматографической колонке «AcclaimPepMap™100» 75 мкм × 25 см, nanoViper C18, 3 мкм 100 Å («Thermo Fisher Scientific»). Масс-спектры получали на тандемном квадрупольном времяпролетном масс-спектрометре с высоким разрешением класса UHR-TOF с ионизацией электроспреем. Масс-спектры конвертировали в формат Mascotgeneric, учитывая в качестве переменных модификаций карбамидометилирование цистеина, окисление метионина и ацетилирование лизина. Поиск проводили относительно базы данных NCBI² с таксономическим ограничением для исследуемого вида микроорганизмов.

Изучение выживаемости штаммов *V. cholerae* в условиях осмотического и оксидативного стресса проводили по методике, описанной S.N. Wai с соавт. [11]. Культуры анализируемых штаммов в одинаковой концентрации помещали в 3 М раствор NaCl (осмотический стресс) или 20 мМ раствор H₂O₂ (оксидативный стресс) и через равные промежутки времени проводили высевы бактерий на чашки с LB агаром. Через 18–24 ч инкубации посевов при 37°C подсчитывали количество выросших бактерий каждого штамма. Эксперимент проводили трехкратно, результаты представляли в виде среднего значения и стандартной ошибки средней арифметической.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнительный протеомный анализ

При проведении 2D-электрофореза у типичного изолята *V. cholerae* M1062 выявлено 231 белковое пятно, у геноварианта M1509 — 229, во фракции экзопротеинов — 71 и 98 соответственно. Для последующей идентификации были взяты белковые пятна, экспрессия которых отличалась в 1,5 раза и более. В лизатах клеток таких белков было 14, из которых были идентифицированы 12; во фракции экзопротеинов — 26, функциональная значимость всех данных белков была установлена.

В результате идентификации (рис. 1) были аннотированы как гипотетические 2 белка в лизатах клеток (№ 10, экспрессия увеличена в 2 раза у штамма M1509; № 12, экспрессия увеличена в 10 раз у штамма M1062) и 4 белка во фракции экзопротеинов (№ 7, 13, 14, экспрессия увеличена в 7, 3, 6 раз соответственно у штамма M1062, и № 23, присутствует только у M1509).

Подавляющая часть других идентифицированных белков в клеточных лизатах изучаемых штаммов функционально связана с углеводным обменом, метаболизмом аминокислот и энергетическими процессами в клетке. Так, у типичного штамма была отмечена повышенная продукция:

¹ СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)».

² URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

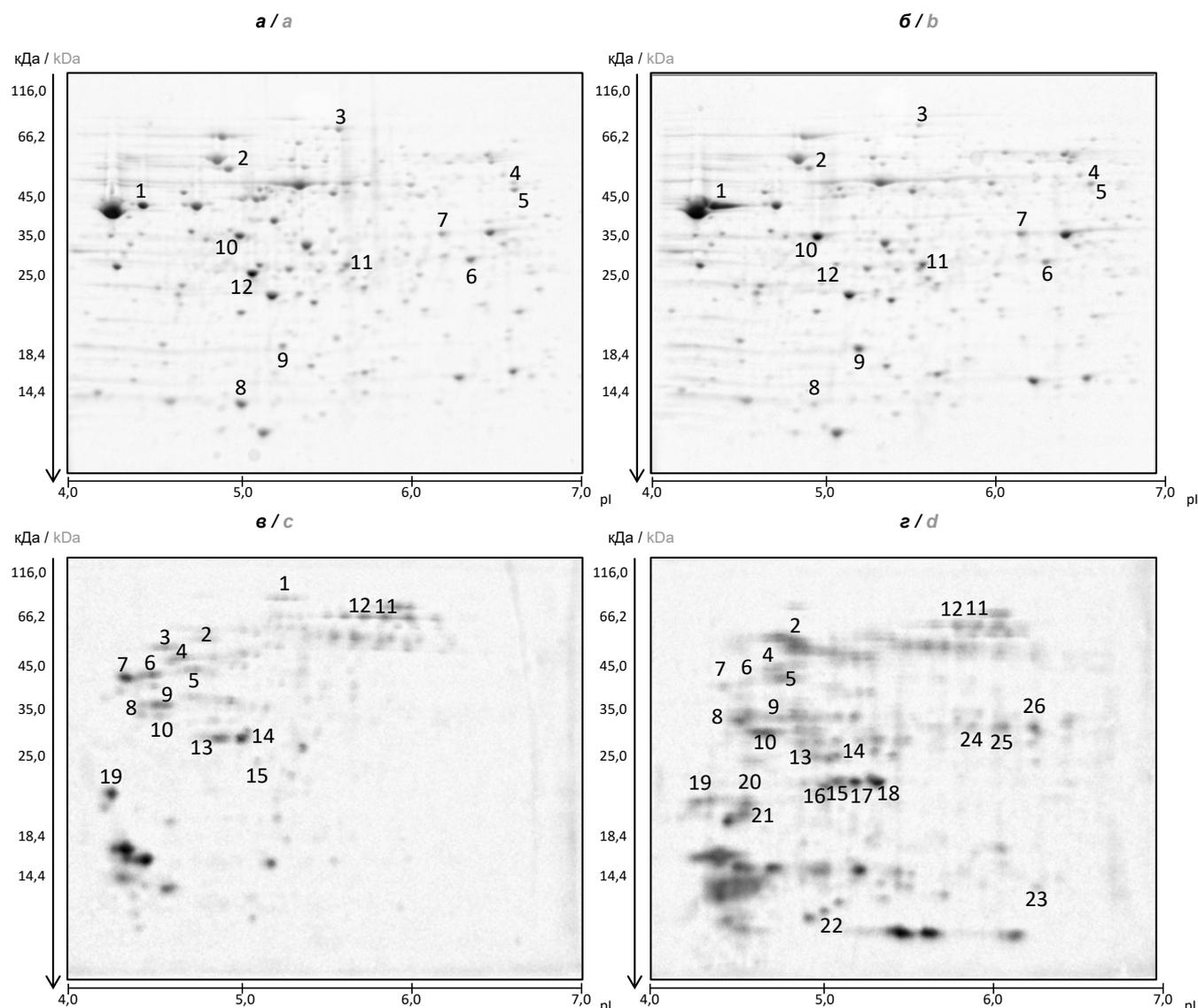


Рис. 1. 2D-электрофореграммы клеточных лизатов (а, б) и фракции экзопротеинов (в, г) типичного штамма *V. cholerae* M1062 биовара Эль Тор (а, в) и геноварианта M1509 (б, г).

Fig. 1. 2D gel electrophoregrams of cell lysates (a, b) and exoprotein fraction (c, d) of a typical strain *V. cholerae* M1062 biotype EI Tor (a, c) and altered EI Tor strain M1509 (b, d).

- β -субъединицы АТФ-синтазы (ЕС 7.1.2.2, пятно № 2, экспрессия увеличена в 2,5 раза), участвующей в процессе синтеза АТФ из АДФ и неорганического фосфата;
- фосфатацетилтрансферазы (ЕС 2.3.1.8, пятно № 3, экспрессия увеличена в 1,5 раза), катализирующей переход ацетил-КоА в ацетилфосфат (метаболизм углеводов);
- аланинрацемазы (ЕС 5.1.1.1, пятно № 5, экспрессия увеличена в 3,5 раза), превращающей L-аланин в его энантиомер D-аланин, который является структурным компонентом пептидогликана;
- уридинфосфорилазы (ЕС 2.4.2.3, пятно № 6, экспрессия увеличена в 1,5 раза), участвующей

щей в превращении уридина в урацил (метаболизм пиримидинов);

- глицил-радикального кофактора GrcA (пятно № 8, экспрессия увеличена в 3,5 раза), восстанавливающего пируватформиатлиазу (метаболизм глюкозы) при ее повреждении в результате оксидативного стресса [12, 13].

При сравнительном анализе белков, содержащихся в лизате клеток геноварианта *V. cholerae* M1509 относительно типичного штамма M1062, обнаружена повышенная экспрессия:

- глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы I типа (ЕС 1.2.1.12, пятно № 7, экспрессия увеличена в 1,5 раза), обеспечивающей окисление глюкозы с образованием пирувино-

градной кислоты и синтезом АТФ в процессе гликолиза;

- аланиндегидрогеназы (ЕС 1.4.1.1, пятно № 4, экспрессия увеличена в 2 раза), участвующей в образовании аминокислоты аланина;
- субстрат-связывающего АВС-транспортёра вольфрама (пятно № 11, экспрессия увеличена в 1,5 раза), осуществляющего перенос вольфрама, являющегося кофактором ряда ферментов.

Кроме того, у штамма М1509 отмечена повышенная экспрессия двух факторов адаптации: белка-порина внешней мембраны OmpT (пятно № 1, экспрессия увеличена в 2 раза) и пептидил-пролил изомеразы (ЕС 5.2.1.8, пятно № 9, экспрессия увеличена в 3 раза). Согласно данным литературы белки-порины внешней мембраны контролируют поступление воды, гидрофобных молекул и питательных веществ в клетки бактерий. Белок OmpT *V. cholerae*, кроме функций порина, выполняет и другие задачи, в том числе способствует выживанию *V. cholerae* при действии стрессовых факторов как *in vivo*, так и *in vitro* [14]. Пептидил-пролил изомеразы, изменяющие пространственную структуру белков, обладают шаперонной активностью и обеспечивают рефолдинг белков, повреждённых стрессом (например, тепловым шоком) [15].

При анализе секретома штамма М1062 отмечен повышенный биосинтез гемолизина (пятно № 1, присутствует только у данного штамма, пятно № 11 и № 12, экспрессия увеличена в 2 раза). Гемолизин относится к дополнительным факторам вирулентности *V. cholerae*, т.к. способствует образованию пор в эукариотических клетках, что приводит их к гибели. У данного штамма также обнаружена повышенная экспрессия белков, обеспечивающих подвижность. Так, жгутиковый белок FlgE в 1 случае обнаружен только у данного штамма (пятно № 3), или его экспрессия увеличена в 6 раз (пятно № 6). Биосинтез флагеллина (пятно № 9) у штамма М1062 увеличен в 3 раза, но снижен в 1,5 раза в пятне № 8. Как известно, подвижность является ключевым фактором для развития инфекционного процесса при холере: неподвижные или малоподвижные вибрионы не способны преодолевать слизистый слой и прикрепляться к эпителиоцитам кишечника человека [16], а во внешней среде у таких штаммов снижена способность к формированию биопленки [17]. Кроме того, в данном штамме продуцируется в 2 раза больше транспортёра длинноцепочечных жирных кислот (пятно № 4), участвующего в трансмембранном переносе липидов.

Относительно секретрируемых белков, в повышенном количестве продуцируемых штаммом М1509, необходимо отметить биосинтез субстрат-связывающего АВС-транспортёра мальтозы MalE (пятно № 5, экспрессия увеличена в 1,7 раза).

Белок MalE с молекулярной массой 42 289 кДа является частью мальтозного комплекса MalEFGK, участвующего в обеспечении клеток *V. cholerae* мальтозой. Штаммы *V. cholerae* с повреждёнными генами мальтозного регулона обладают сниженной патогенностью в результате уменьшения биосинтеза таких факторов вирулентности, как холерный токсин, токсин-корегулируемые пили адгезии, растворимая гемагглютинин-протеаза, а также ослабленным адаптационным потенциалом вследствие сокращения продукции маннозочувствительных пилей адгезии, обеспечивающих прикрепление *V. cholerae* к субстрату при формировании биоплёнки во внешней среде [18]. Во фракции экзопротеинов, как и в клеточных лизатах, у геноварианта обнаружена повышенная в 2 раза продукция белка-порина внешней мембраны OmpT (пятно № 10). Кроме того, выявлены различия в экспрессии белка внешней мембраны OmpW (пятна № 19, 20, 21), повышающего выживаемость *V. cholerae* в условиях осмотического стресса [19]. В пятне № 19 он присутствует в обоих штаммах (у М1062 экспрессия увеличена в 3 раза), а в пятнах № 20 и № 21 данный белок есть только у М1509. У геноварианта также обнаружено повышенное (2,5 раза) количество N-ацетилглюкозамин-связывающего белка GbrA (пятно № 2), обеспечивающего прикрепление *V. cholerae* к эпителиоцитам кишечника при инфекционном процессе и к хитиновым покровам беспозвоночных при формировании биоплёнки во внешней среде [20]. Белок С4-дикарбоксилат-субстрат-связывающий АВС-транспортёр (пятна № 24, 25, 26), участвующий в активном транспорте трикарбоновых кислот и являющийся одним из индикаторов интенсивных метаболических процессов в клетках [21], был выявлен только у геноварианта.

Особо следует отметить различия между двумя штаммами в продукции ферментов, защищающих клетку от стрессовых факторов внешней среды. Так, только во фракции экзопротеинов геноварианта обнаружена продукция супероксиддисмутазы (ЕС 1.15.1.1., пятно № 17, 18) и тиоредоксина (пятно № 22). Пероксидаза (ЕС 1.11.1.7) также в большем количестве синтезируется данным штаммом (пятно № 15 — экспрессия увеличена в 3 раза, пятно № 16 присутствует только у М1509). Как известно, пероксидаза непосредственно участвует в расщеплении H_2O_2 , а супероксиддисмутаза превращает образующийся в клетках супероксид-анион в H_2O_2 , которая затем нейтрализуется каталазой и пероксидазой. Тиоредоксин — белок с небольшой молекулярной массой — защищает клетки от действия синглетного кислорода и гидроксильных радикалов, а также выступает в качестве донора водорода для пероксидазы.

Поскольку возможной причиной выявленных отличий в экспрессии идентифицированных белков между типичным штаммом и геновариантом могли

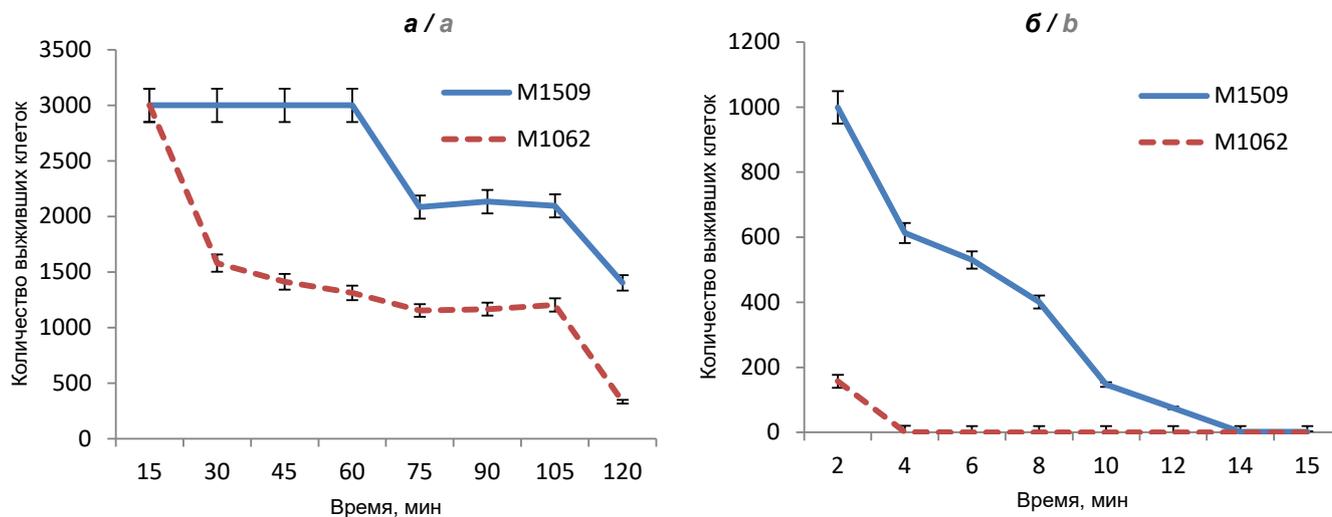


Рис. 2. Выживаемость типичного штамма *V. cholerae* M1062 биовара El Tor и геноварианта M1509 при действии осмотического (а) и оксидативного (б) стресса.

Fig. 2. Survival of a typical strain of *V. cholerae* M1062 biotype El Tor and altered El Tor strain M1509 after osmotic (a) and oxidative (b) stress.

быть изменения в структуре кодирующих генов, мы провели сравнительный анализ их нуклеотидной последовательности. В результате обнаружили, что структура исследуемых генов была одинаковой у обоих штаммов и идентична референсной последовательности штамма *V. cholerae* N16961 биовара El Tor. Исключение составил ген *grcA*, в структуре которого у геноварианта была выявлена делеция аденилового нуклеотида в позиции 41 от начала гена, приводящая к появлению стоп-кодона, вызывающего преждевременную терминацию синтеза белка. Данные изменения в структуре гена *grcA*, вероятно, и являются причиной сниженной продукции штаммом M1509 глицил-радикального кофактора GrcA. Таким образом, изученные штаммы с разным уровнем экспрессии белков, участвующих в энергетическом обмене, процессах метаболизма, транспорта, а также входящих в состав внешней мембраны, практически не различались по структуре исследуемых генов. Полученные данные позволяют предположить, что повышенная экспрессия ряда белков геновариантом могла возникнуть в результате изменения регуляторного механизма транскрипции кодирующих их генов.

Устойчивость штаммов *V. cholerae* M1062 и M1509 к осмотическому и оксидативному стрессу

Учитывая полученные данные о повышенной экспрессии геновариантом M1509 белков, защищающих клетки *V. cholerae* при действии осмотического и оксидативного стресса, на следующем этапе нами была проведена оценка сравнительной устойчивости типичного штамма и геноварианта к действию данных стрессовых факторов. В резуль-

тате изучения выживаемости исследуемых штаммов при действии высоких (3 М) концентраций соли и H_2O_2 (20 мМ) выявлено, что штамм M1509 отличается повышенной устойчивостью к данным стрессовым факторам. Так, через 15 мин инкубации в растворе NaCl количество выросших клеток двух штаммов было практически одинаковым. Однако через 30 мин КОЕ штамма M1509 в 2 раза превышало данный показатель штамма M1062, и до конца эксперимента (120 мин) количество живых бактерий геноварианта было выше, чем у типичного штамма (рис. 2, а). Еще более показательные результаты получены при изучении выживаемости штаммов в условиях оксидативного стресса. Бактерии штамма M1062 оказались значительно более чувствительными и выдерживали не более 4 мин инкубации в 20 мМ растворе H_2O_2 , в то время как у штамма M1509 единичные жизнеспособные клетки обнаруживались и конце эксперимента (12–13 мин инкубации) (рис. 2, б).

Таким образом, в результате проведенных исследований показано, что генетически измененный штамм *V. cholerae* M1509, в отличие от типичного изолята M1062, является более устойчивым к действию осмотического и оксидативного стресса. Вероятно, одной из причин такой устойчивости является повышенный биосинтез данным штаммом пероксидазы, супероксиддисмутазы, тиоредоксина, белков внешней мембраны OmpW и OmpT.

Обсуждение

Глобальное распространение недавно возникших геновариантов возбудителя холеры El Tor, отличающихся от типичных штаммов, вызвавших начало 7-й пандемии холеры, присутствием мута-

ций в различных участках генома, связанных с вирулентным и эпидемическим потенциалом, диктует необходимость сравнительной оценки уровня экспрессии их белков. В результате протеомного анализа лизатов типичного и генетически измененного штаммов белки, которые синтезировались бы только у одного из них, не выявлены. У обоих штаммов обнаружен примерно одинаковый уровень экспрессии белков, участвующих в энергетическом (синтез АТФ) обмене, процессах адаптации (у типичного штамма — белок GrcA, у геноварианта — OmpT и пептидил-пролил изомеразы), а также в различных клеточных процессах. В том числе у типичного штамма — в биосинтезе компонента клеточной стенки, метаболизме ДНК; у геноварианта — белка-транспортера и белковом синтезе.

При анализе экзопротеинов выявлено, что как типичный штамм, так и геновариант продуцируют дополнительные факторы вирулентности (гемолизин, транспортер мальтозы, белки жгутика, GbpA), а также белки, участвующие в процессах метаболизма (транспортер длинноцепочечных жирных кислот, С4-дикарбоксилат-субстрат-связывающий АВС-транспортёр). При этом необходимо отметить, что ряд идентифицированных белков (N-ацетилглюкозамин-связывающий белок GbpA, белки жгутика, субстрат-связывающий АВС-транспортёр мальтозы MalE) являются многофункциональными и участвуют как в патогенезе, так и в процессах адаптации возбудителя холеры к меняющимся условиям внешней среды. В то же время при исследовании секретируемых белков был обнаружен ряд существенных отличий между штаммами относительно продукции белков адаптации. Так, анализ фракции экзопротеинов продемонстрировал усиленный биосинтез штаммом M1509 пероксидазы, супероксиддисмутазы и антиоксиданта тиоредоксина. Особо следует отметить повышенную продукцию белка внешней мембраны OmpW, участвующего в транспорте L-карнитина, относящегося к группе совместимых осморегуляторных веществ [19]. Данная группа низкомолекулярных соединений широко используется многими видами бактерий для поддержания оптимального осмотического давления в цитоплазме клетки.

В ранее проведенном исследовании других модельных штаммов нами показано, что геноварианты *V. cholerae* биовара El Tor отличаются большей устойчивостью к действию осмотического и оксидативного стресса по сравнению с типичными штаммами. При этом более высокая выживаемость геновариантов при действии осмотического стресса была связана с их способностью формировать защитный экзополисахаридный слой раньше, чем типичные штаммы El Tor. Однако причину повышенной выживаемости геновариантов при действии окислительного стресса выявить не удалось [22]. Протеомный анализ позволил глубже понять при-

чины лучшей выживаемости геновариантов в неблагоприятных условиях внешней среды, показав, что механизм их устойчивости к действию как осмотического, так и окислительного стресса связан также с повышенной продукцией защитных белков.

Таким образом, протеомный анализ типичного и генетически измененного штаммов *V. cholerae* биовара El Tor свидетельствует о повышенной экспрессии у геновариантов белков, обеспечивающих устойчивость бактерий к действию стрессовых факторов внешней среды, что, возможно, является одним из механизмов их повышенной выживаемости в меняющихся условиях окружающей среды и, как следствие, их широкого распространения. Кроме того, полученные сведения позволяют выявить новые биомаркеры, которые могут быть использованы для дифференциации типичных штаммов и геновариантов *V. cholerae* биовара El Tor.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бароян О.В. *Холера Эль Тор*. М.: Медицина; 1971.
2. Faruque S.M., Albert M.J., Mekalanos J.J. Epidemiology, genetics and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998; 62(4): 1301–14.
3. Nair G.B., Faruque S.M., Bhuiyan N.A., Kamruzzaman M., Siddique A.K., Sack D.A. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(9): 3296–9. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.9.3296-3299.2002>
4. Kumar P., Jain M., Goel A.K., Bhadauria S., Sharma S.K., Kamboj D.V., et al. A large cholera outbreak due to a new cholera toxin variant of the *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype in Orissa, Eastern India. *J. Med. Microbiol.* 2009; 58(Pt. 2): 234–8. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.002089-0>
5. Son M.S., Megli C.J., Kovacicova G., Qadri F., Taylor R.K. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype variant clinical isolates from Bangladesh and Haiti, including a molecular genetic analysis of virulence genes. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49(11): 3739–49. <https://doi.org/10.1128/JCM.01286-11>
6. Смирнова Н.И., Агафонов Д.А., Кульшань Т.А., Краснов Я.М., Кутырев В.В. Микроэволюция возбудителя холеры в современный период. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2014; 69(7-8): 46–53. <https://doi.org/10.15690/vramn.v69i7-8.1109>
7. Kuleshov K.V., Vodop'ianov S.O., Dedkov V.G., Markelov M.L., Deviatkin A.A., Kruglikov V.D., et al. Travel-associated *Vibrio cholerae* O1 El Tor. *Emerg. Infect. Dis.* 2016; 22(11): 2006–8. <https://doi.org/10.3201/eid2211.151727>
8. Grim C.J., Hasan N.A., Taviani E., Haley B., Chun J., Brettin T.S., et al. Genome sequence of hybrid *Vibrio cholerae* O1 MJ-1236, B-33, and CIRS101 and comparative genomics with *V. cholerae*. *J. Bacteriol.* 2010; 192(13): 3524–33. <https://doi.org/10.1128/JB.00040-10>
9. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680–5. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
10. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248–54. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
11. Wai S.N., Mizunoe Y., Takade A., Kawabata S.I., Yoshida S.I. *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance,

- and biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 64(10): 3648–55. <https://doi.org/10.1128/aem.64.10.3648-3655.1998>
- Shiba T., Hill R.T., Straube W.L., Colwell R.R. Decrease in culturability of *Vibrio cholerae* caused by glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995; 61(7): 2583–8. <https://doi.org/10.1128/aem.61.7.2583-2588.1995>
 - Wagner A.F., Schultz S., Bomke J., Pils T., Lehmann W.D., Knappe J. YfiD of *Escherichia coli* and Y06I of bacteriophage T4 as autonomous glycyl radical cofactors reconstituting the catalytic center of oxygen-fragmented pyruvate formate-lyase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 285(2): 456–62. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5186>
 - Provenzano D., Lauriano C.M., Klose K.E. Characterization of the role of the ToxR-modulated outer membrane porins OmpU and OmpT in *Vibrio cholerae* virulence. *J. Bacteriol.* 2001; 183(12): 3652–62. <https://doi.org/10.1128/JB.183.12.3652-3662.2001>
 - Кромина К.А., Игнатов А.Н., Абдеева И.А. Участие пептидил-пролил-цис/транс-изомераз в патологическом процессе. *Биологические мембраны.* 2008; 25(4): 243–51.
 - Gardel C.L., Mekalanos J.J. Alterations in *Vibrio cholerae* motility phenotypes correlate with changes in virulence factor expression. *Infect. Immun.* 1996; 64(6): 2246–55. <https://doi.org/10.1128/iai.64.6.2246-2255.1996>
 - Watnick P.I., Kolter R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol. Microbiol.* 1999; 34(3): 586–95. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01624.x>
 - Lang H., Jonson G., Holmgren J., Palva E.T. The maltose regulon of *Vibrio cholerae* affects production and secretion of virulence factors. *Infect. Immun.* 1994; 62(11): 4781–8. <https://doi.org/10.1128/iai.62.11.4781-4788.1994>
 - Fu X., Zhang J., Li T., Zhang M., Li J., Kan B. The outer membrane protein OmpW enhanced *V. cholerae* growth in hypersaline conditions by transporting carnitine. *Front. Microbiol.* 2018; 8: 2703. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02703>
 - Kirn T.J., Jude B.A., Taylor R.K. A colonization factor links *Vibrio cholerae* environmental survival and human infection. *Nature.* 2005; 438(7069): 863–6. <https://doi.org/10.1038/nature04249>
 - Xu Q., Dziejman M., Mekalanos J.J. Determination of the transcriptome of *Vibrio cholerae* during intrainestinal growth and midexponential phase *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003; 100(3): 1286–91. <https://doi.org/10.1073/pnas.0337479100>
 - Заднова С.П., Плеханов Н.А., Крепостнова И.М., Ерохин П.С., Смирнова Н.И. Влияние осмотического и окислительного стрессов на штаммы геновариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2015; 92(6): 55–62.
- clinical isolates from Bangladesh and Haiti, including a molecular genetic analysis of virulence genes. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49(11): 3739–49. <https://doi.org/10.1128/JCM.01286-11>- Smirnova N.I., Agafonov D.A., Kul'shan' T.A., Krasnov Ya.M., Kutyrev V.V. Microevolution of cholera agent in the modern period. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk.* 2014; 69(7-8): 46–53. <https://doi.org/10.15690/vramn.v69i7-8.1109> (in Russian)
- Kuleshov K.V., Vodop'ianov S.O., Dedkov V.G., Markelov M.L., Deviatkin A.A., Kruglikov V.D., et al. Travel-associated *Vibrio cholerae* O1 El Tor. *Emerg. Infect. Dis.* 2016; 22(11): 2006–8. <https://doi.org/10.3201/eid2211.151727>
- Grim C.J., Hasan N.A., Taviani E., Haley B., Chun J., Brettin T.S., et al. Genome sequence of hybrid *Vibrio cholerae* O1 MJ-1236, B-33, and CIRS101 and comparative genomics with *V. cholerae*. *J. Bacteriol.* 2010; 192(13): 3524–33. <https://doi.org/10.1128/JB.00040-10>
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259): 680–5. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248–54. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Wai S.N., Mizunoe Y., Takade A., Kawabata S.I., Yoshida S.I. *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 64(10): 3648–55. <https://doi.org/10.1128/aem.64.10.3648-3655.1998>
- Shiba T., Hill R.T., Straube W.L., Colwell R.R. Decrease in culturability of *Vibrio cholerae* caused by glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995; 61(7): 2583–8. <https://doi.org/10.1128/aem.61.7.2583-2588.1995>
- Wagner A.F., Schultz S., Bomke J., Pils T., Lehmann W.D., Knappe J. YfiD of *Escherichia coli* and Y06I of bacteriophage T4 as autonomous glycyl radical cofactors reconstituting the catalytic center of oxygen-fragmented pyruvate formate-lyase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 285(2): 456–62. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5186>
- Provenzano D., Lauriano C.M., Klose K.E. Characterization of the role of the ToxR-modulated outer membrane porins OmpU and OmpT in *Vibrio cholerae* virulence. *J. Bacteriol.* 2001; 183(12): 3652–62. <https://doi.org/10.1128/JB.183.12.3652-3662.2001>
- Kromina K.A., Ignatov A.N., Abdeeva I.A. Role of peptidyl-prolyl-cis/trans-isomerases in pathologic processes. *Biologicheskie membrany.* 2008; 25(4): 243–51. (in Russian)
- Gardel C.L., Mekalanos J.J. Alterations in *Vibrio cholerae* motility phenotypes correlate with changes in virulence factor expression. *Infect. Immun.* 1996; 64(6): 2246–55. <https://doi.org/10.1128/iai.64.6.2246-2255.1996>
- Watnick P.I., Kolter R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol. Microbiol.* 1999; 34(3): 586–95. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01624.x>
- Lang H., Jonson G., Holmgren J., Palva E.T. The maltose regulon of *Vibrio cholerae* affects production and secretion of virulence factors. *Infect. Immun.* 1994; 62(11): 4781–8. <https://doi.org/10.1128/iai.62.11.4781-4788.1994>
- Fu X., Zhang J., Li T., Zhang M., Li J., Kan B. The outer membrane protein OmpW enhanced *V. cholerae* growth in hypersaline conditions by transporting carnitine. *Front. Microbiol.* 2018; 8: 2703. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02703>
- Kirn T.J., Jude B.A., Taylor R.K. A colonization factor links *Vibrio cholerae* environmental survival and human infection. *Nature.* 2005; 438(7069): 863–6. <https://doi.org/10.1038/nature04249>
- Xu Q., Dziejman M., Mekalanos J.J. Determination of the transcriptome of *Vibrio cholerae* during intrainestinal growth and

REFERENCES

- Baroyan O.V. *Cholera El Tor [Kholera El' Tor]*. Moscow: Meditsina; 1971. (in Russian)
- Faruque S.M., Albert M.J., Mekalanos J.J. Epidemiology, genetics and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998; 62(4): 1301–14.
- Nair G.B., Faruque S.M., Bhuiyan N.A., Kamruzzaman M., Siddique A.K., Sack D.A. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(9): 3296–9. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.9.3296-3299.2002>
- Kumar P., Jain M., Goel A.K., Bhaduria S., Sharma S.K., Kamboj D.V., et al. A large cholera outbreak due to a new cholera toxin variant of the *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype in Orissa, Eastern India. *J. Med. Microbiol.* 2009; 58(Pt. 2): 234–8. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.002089-0>
- Son M.S., Megli C.J., Kovacicova G., Qadri F., Taylor R.K. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype variant

- midexponential phase *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003; 100(3): 1286–91. <https://doi.org/10.1073/pnas.0337479100>
22. Zadnova S.P., Plekhanov N.A., Krepostnova I.M., Erokhin P.S., Smirnova N.I. Effect of osmotic and oxidative stress on strains

of genovariants of *Vibrio cholerae* El Tor biovar. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2015; 92(6): 55–62. (in Russian)

Информация об авторах

Плекханов Никита Александрович[✉] — к.б.н., с.н.с. лаб. патогенных вибрионов отдела микробиологии РосНИПЧИ «Микроб», 410005, Саратов, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2355-7018>.
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Заднова Светлана Петровна — д.б.н., в.н.с. лаб. патогенных вибрионов отдела микробиологии РосНИПЧИ «Микроб», 410005, Саратов, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4366-0562>.

Крицкий Андрей Александрович — к.б.н., зав. лаб. патогенных вибрионов отдела микробиологии РосНИПЧИ «Микроб», 410005, Саратов, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5506-4285>.

Полунина Татьяна Алексеевна — к.м.н., с.н.с. лаб. геномного и протеомного анализа отдела микробиологии РосНИПЧИ «Микроб», 410005, Саратов, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2234-2760>.

Котова Нина Владимировна — м.н.с. лаб. геномного и протеомного анализа отдела микробиологии РосНИПЧИ «Микроб», 410005, Саратов, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9270-523X>.

Баданин Даниил Вячеславович — м.н.с. лаб. геномного и протеомного анализа отдела микробиологии РосНИПЧИ «Микроб», 410005, Саратов, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9662-8438>.

Смирнова Нина Ивановна — д.б.н., проф., г.н.с. лаб. патогенных вибрионов отдела микробиологии РосНИПЧИ «Микроб», 410005, Саратов, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4785-4110>.

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Information about the authors

Nikita A. Plekhanov[✉] — PhD (Biol.), senior researcher, Laboratory of pathogenic vibrios, Department of microbiology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 410005, Saratov, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2355-7018>.
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Svetlana P. Zadnova — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of pathogenic vibrios, Department of microbiology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 410005, Saratov, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4366-0562>.

Andrey A. Kritsky — PhD (Biol.), Head, Laboratory of pathogenic vibrios, Department of microbiology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 410005, Saratov, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5506-4285>.

Tatyana A. Polunina — PhD (Med.), senior researcher, Laboratory of genomic and proteomic analysis, Department of microbiology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 410005, Saratov, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2234-2760>.

Nina V. Kotova — junior researcher, Laboratory of genomic and proteomic analysis, Department of microbiology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 410005, Saratov, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9270-523X>.

Daniil V. Badanin — junior researcher, Laboratory of genomic and proteomic analysis, Department of microbiology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 410005, Saratov, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9662-8438>.

Nina I. Smirnova — D. Sci. (Biol.), main researcher, Laboratory of pathogenic vibrios, Department of microbiology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 410005, Saratov, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4785-4110>.

Contribution: the authors contributed equally to this article.



Совершенствование методики SNP-типирования штаммов *Vibrio cholerae* на основе анализа первичных данных полногеномного секвенирования

А.С. Водопьянов[✉], Р.В. Писанов, С.О. Водопьянов, И.П. Олейников

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия

Цель работы — совершенствование метода оценки качества единичных нуклеотидных замен, используемых для SNP-типирования, на основе анализа их распределения в первичных данных полногеномного секвенирования (ридах).

Материалы и методы. В работе использованы данные полногеномного секвенирования 56 штаммов *Vibrio cholerae*, полученные на секвенаторах разных типов. Программное обеспечение разрабатывали на языке программирования Java. Кластерный анализ и построение дендрограммы проведены с использованием авторского программного обеспечения по методу UPGMA.

Результаты и обсуждение. Показана «нестабильность» определения ряда SNP в геноме возбудителя холеры. Разработан метод подбора перечня SNP для филогенетического анализа на основе обработки первичных данных полногеномного секвенирования (ридов). Предложена методика использования «контрольных геномов» при проведении кластерного анализа данных полногеномного секвенирования.

Заключение. Составлен перечень из 3198 «стабильных SNP» для проведения филогенетического анализа. Показана генетическая близость нетоксигенных штаммов, содержащих ген *tcpA* (*ctxAB-tcpA*⁺), и *preCTX*-штаммов *V. cholerae*.

Ключевые слова: холера; генотипирование; секвенирование; филогенетический анализ; единичные нуклеотидные замены.

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

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

Для цитирования: Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Водопьянов С.О., Олейников И.П. Совершенствование методики SNP-типирования штаммов *Vibrio cholerae* на основе анализа первичных данных полногеномного секвенирования. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2020; 97(6): 587–593.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-6-9>

Поступила 10.07.2019
Принята в печать 15.09.2020

Improvement of the technique of SNP-typing of *Vibrio cholerae* strains on the basis of the analysis of the primary data of whole genome sequencing

Alexey S. Vodopianov[✉], R.V. Pisanov, Sergey O. Vodopianov, Igor P. Oleynikov

Rostov-on-Don Research Institute for Plague Control, Russia, 344019, Rostov-on-Don, Russia

Aim. To improve the method of the quality assessment of single nucleotide polymorphisms, which are used for SNP-typing, based on the analysis of their distribution in the primary data of whole genome sequencing (reads).

Materials and methods. Data of the whole genome sequencing of 56 *Vibrio cholerae* strains obtained using different types of sequencers were used. The software was developed using Java programming language. Cluster analysis and construction of the dendrogram were performed with the author's software using the UPGMA method.

Results and discussion. The «instability» of detection the number of SNP in the genome of cholera causative agent was shown. The method of selection of the SNP list for phylogenetic analysis based on the analysis of the primary data of whole genome sequencing (reads), has been developed. The method of using «control genomes» for cluster analysis of whole genome sequencing data has been proposed.

Conclusion. The list of 3198 «stable SNP» for phylogenetic analysis has been composed. Genetic affinity between the non-toxicogenic strains that contain the *tcpA* gene (*ctxAB-tcpA*⁺) and *preCTX*-strains of *V. cholerae* was shown.

Keywords: *cholera; genotyping; sequence; phylogenetic analysis; single nucleotide polymorphisms.*

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

For citation: Vodopianov A.S., Pisanov R.V., Vodopianov S.O., Oleynikov I.P. Improvement of the technique of SNP-typing of *Vibrio cholerae* strains on the basis of the analysis of the primary data of whole genome sequencing. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(6): 587–593. (In Russ.).
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-6-9>

Received 10 July 2019

Accepted 15 September 2020

Введение

Методы генотипирования на основе анализа распределения единичных нуклеотидных замен (single nucleotide polymorphism, SNP) возбудителей опасных инфекционных болезней, в том числе холеры, широко используются в научных исследованиях и эпидемиологическом анализе, поскольку позволяют оценить филогенетические связи между разными штаммами, установить их возможное происхождение, а также источники и пути распространения инфекции. Исследователи используют различные наборы SNP-маркеров, что может приводить к расхождению результатов даже при изучении одного набора штаммов. Например, ранее анализ данных полногеномного секвенирования (whole genome sequencing, WGS) позволил выявить, что клинические штаммы *Vibrio cholerae* O1, выделенные в 2010 г. в Москве (завоз из Индии), относятся к штаммам «гаитянской группы» [1], однако при анализе с использованием другого набора SNP они попали в группу «непальских штаммов», дистанцированную от вызвавших вспышку на острове Гаити [2].

В ряде случаев набор SNP-маркеров строится непосредственно для анализируемого набора штаммов. Например, именно такой алгоритм используется в программе kSNP 3.0 [3], что было использовано для генотипирования штаммов *V. cholerae*, выделенных в Демократической Республике Конго [4].

Это подчеркивает актуальность работ по совершенствованию и стандартизации подходов к анализу полногеномных сиквенсов [5] и, соответственно, отбору SNP-маркеров, используемых для генотипирования.

Как правило, результаты WGS представлены «ридами» — последовательностями ДНК размером 100–300 п.о., которые многократно дублируются. В дальнейшем с помощью специализированных программ проводится их сборка в контиги, размеры которых могут достигать сотен тысяч нуклеотидов. При этом существенно сокращается общий объем: так, если набор ридов составляет около 600–900 Мб, то суммарный объем контигов, как правило, не превышает 7 Мб. Это приводит к тому, что большинство исследователей предпочитают работать именно с контигами, а не с ридами.

Однако такой подход имеет существенный недостаток, заключающийся в обработке ошибок. Важно отметить, что если в ридах присутствуют замены нуклеотидов, то программа-сборщик в качестве «правильного» выбирает самый часто встречающийся вариант, вне зависимости от того, встречается он в 99% или в 50% случаев. Таким образом, при работе с контигами может теряться весьма важная информация о достоверности выявляемых SNP.

В связи с этим цель работы состояла в разработке метода оценки качества SNP, используемых для SNP-типирования, на основе анализа их распределения в первичных данных WGS (ридах).

Материалы и методы

В работе использованы данные WGS 56 штаммов разных серогрупп, полученные на платформе «MiSeq Illumina» в лаборатории диагностики особо опасных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт», и геномы, включенные в локальную базу геномов, секвенирование которых проведено другими группами исследователей (табл. 1).

Программное обеспечение разрабатывали на языке программирования Java. Кластерный анализ и построение дендрограммы проводили с использованием обеспечения по методу UPGMA. Для построения дендрограммы использовали программу MEGA 5 [6].

Результаты и обсуждение

Для анализа был использован набор SNP-маркеров, выявленный ранее при анализе данных WGS штаммов *V. cholerae* [7]. Для этого нами было разработано программное обеспечение, позволяющее оценивать встречаемость каждого SNP непосредственно в наборе ридов. Для каждого изучаемого SNP была посчитана встречаемость в наборе данных первичного секвенирования (ридах) каждого нуклеотида. Примеры результатов анализа нескольких SNP-маркеров представлены в табл. 2, из которой можно видеть, что SNP в позиции 316 в гене *VC0275* штамма *V. cholerae* 81 представлена именно тиминотом (Т), который обнаружен в 79 ридах, в то время как наличие ридов с аденином (А) и

Таблица 1. Геномы штаммов, использованные в работе
Table 1. Genomes of the strains used in the study

Штамм Strain	Место выделения Place of isolation	Год выделения Year of isolation	Штамм Strain	Место выделения Place of isolation	Год выделения Year of isolation
<i>V. cholerae</i> O1 CTX⁺VPI-I⁺			<i>V. cholerae</i> O1 CTX⁺VPI-I⁺		
16228	Республика Дагестан, Россия Republic of Dagestan, Russia	1994	18785	Республика Саха, Россия Republic of Sakha, Russia	2003
17290	Республика Дагестан, Россия Republic of Dagestan, Russia	1994	2687*	Республика Калмыкия, Россия Republic of Kalmykia, Russia	2015
17296	Республика Дагестан, Россия Republic of Dagestan, Russia	1994	94	Ростов-на-Дону, Россия Rostov-on-Don, Russia	2018
1786	Гаити Haiti	2010	M1501*	Республика Калмыкия, Россия Republic of Kalmykia, Russia	2011
18329	Ростов-на-Дону, Россия Rostov-on-Don, Russia	2001	M1518*	Республика Калмыкия, Россия Republic of Kalmykia, Russia	2012
18369	Ростов-на-Дону, Россия Rostov-on-Don, Russia	2007	M1524*	Республика Калмыкия, Россия Republic of Kalmykia, Russia	2013
301	Таганрог, Россия Taganrog, Russia	2001	МАК97*	Индонезия Indonesia	1937
31*	Мариуполь, Украина Mariupol, Ukraine	2011	P-18778*	Ростов-на-Дону, Россия Rostov-on-Don, Russia	2005
3265_80*	Москва, Россия Moscow, Russia	2014	P18899-D*	Тверь, Россия Tver, Russia	2006
3569-08*	США USA	2008	RND18899*	Тверь, Россия Tver, Russia	2006
39*	Мариуполь, Украина Mariupol, Ukraine	2011	<i>V. cholerae</i> O1 CTX⁺VPI-I⁺		
43*	Мариуполь, Украина Mariupol, Ukraine	1994	18984	Краснодарский край, Россия Krasnodar Kray, Russia	2007
56*	Мариуполь, Украина Mariupol, Ukraine	1994	19178	Иркутская область, Россия Irkutsk region, Russia	2015
81-S*	Ростов-на-Дону, Россия Rostov-on-Don, Russia	2014	19308	Астраханская область, Россия Astrakhan region, Russia	2012
81c	Ростов-на-Дону, Россия Rostov-on-Don, Russia	2014	20000	Ростов-на-Дону, Россия Rostov-on-Don, Russia	2016
CIRS101*	Бангладеш Bangladesh	2002	433*	Сочи, Россия Sochi, Russia	2015
E506*	США USA	1974	434	Сочи, Россия Sochi, Russia	2015
HC-23A1*	Гаити Haiti	2010	CP1037(10)*	Мексика Mexico	2003
МАК676*	Индонезия Indonesia	1937	Env-390*	Гаити Haiti	2012
MJ-1236*	Бангладеш Bangladesh	1994	M1522*	Республика Калмыкия, Россия Republic of Kalmykia, Russia	2014
MS6*	Тайланд Thailand	2008	<i>V. cholerae</i> O1 preCTX⁺		
P13762	Ташкент, Узбекистан Tashkent, Uzbekistan	1988	pre_13767	Узбекистан Uzbekistan	1998
RND6878*	Москва, Россия Moscow, Russia	2012	pre_15500	Крым, Украина Crimea, Ukraine	1991
VC51*	Индия India	1992	pre_18963	Ростов-на-Дону, Россия Rostov-on-Don, Russia	2007
<i>V. cholerae</i> O139 CTX⁺VPI-I⁺			pre_9961	Москва, Россия Moscow, Russia	1977
4260B*	Бангладеш Bangladesh	1993	<i>V. cholerae</i> nonO1/nonO139		
E306*	Китай China	2013	16002	Узбекистан Uzbekistan	1971
MO10*	Бангладеш Bangladesh	1992	CP1117*	США USA	2010
VC4370*	Малайзия Malaysia	2008	V51*	США USA	1987
			V52*	Судан Sudan	1968
			nag16150	Узбекистан Uzbekistan	1987

Примечание. *Геномы получены из базы данных NCBI.
Note. *Genomes obtained from the NCBI database.

Таблица 2. Оценка встречаемости единичных нуклеотидных замен в наборе ридов штаммов *V. cholerae* 81 и *V. cholerae* HC-72 (фрагмент). Указано количество ридов, в которых встречается тот или иной нуклеотид**Table 2.** Estimation of the occurrence of single nucleotide polymorphisms in the read set of strains *V. cholerae* 81 and *V. cholerae* HC-72 (fragment). The number of rows in which a particular nucleotide occurs is indicated

N	Ген Gene	Позиция Position	<i>V. cholerae</i> 81				<i>V. cholerae</i> HC-72			
			A	T	G	C	A	T	G	C
1	VC0275	316	1	79	0	2	0	126	0	0
2	VC0289	564	36	0	0	0	134	1	0	0
3	VC0321	334	0	0	0	207	0	0	0	443
4	VC0345	1047	0	0	1	116	0	0	0	176
5	VC0362	833	148	0	154	1	268	1	241	0
6	VC0362	944	0	133	1	133	0	226	0	206

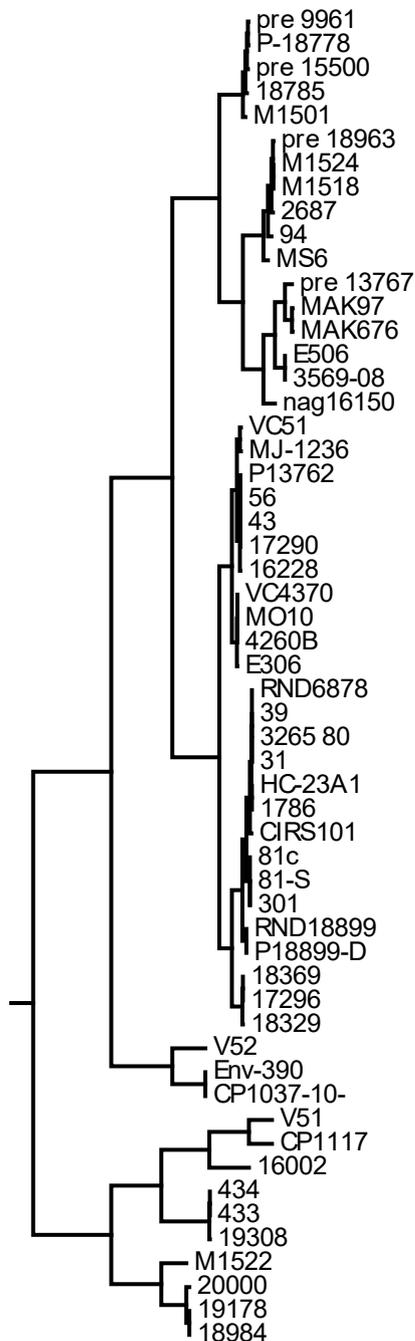
цитозином (2 рида) является ошибкой секвенирования. Аналогичные результаты получены и для генов *VC0289*, *VC0321* и *VC0345*.

В противовес этому для гена *VC0362* почти половина ридов у штамма *V. cholerae* 81 в позиции 833 содержала аденин (148 ридов), а половина (154 рида) — гуанин. Такое распределение не позволяет рассматривать это как ошибку секвенирования, тем более что аналогичное распределение наблюдается у штамма *V. cholerae* HC-72, WGS которого проведено другой группой исследователей. Причиной такой «нестабильности» нуклеотидов может являться существование в геноме нескольких копий гена или сходных нуклеотидных мотивов в разных генах, содержащих замены, однако это требует дальнейшего изучения. Тем не менее, вне зависимости от причины, при сборке контигов выбор «итонового» нуклеотида может быть практически случайным и зависеть от незначительного преобладания ридов с тем или иным нуклеотидом. Ярким примером может служить вышеописанный SNP в гене *VC0362*: так, у штамма *V. cholerae* 81 преобладают риды, содержащие в позиции 833 гуанин, а у *V. cholerae* HC-72 — аденин. Нам представляется нецелесообразным использовать при анализе подобных «нестабильные» SNP, в связи с чем описанный ранее перечень [7] был сокращен с 3683 до 3198 SNP путем удаления SNP, в которых наиболее часто встречаемый вариант обнаруживался менее чем в 70% случаев. Также очевидно, что выбор схемы SNP-типирования должен осуществляться, исходя из анализа первичных данных секвенирования (ридов), а не результата сборки (контигов).

Довольно информативным методом кластерного анализа является UPGMA — метод невзвешенных парных групп со средним арифметическим [8–11]. Сравнительный анализ показывает конкордантность результатов UPGMA и других методов анализа, в частности, методов минимального остовного дерева и максимальной бережливости [12, 13].

На основе кластерного анализа по методу UPGMA с использованием предлагаемого набора SNP нами была построена дендрограмма, отражающая генетическую близость между геномами 56 штаммов *V. cholerae* различного происхождения (**рисунок**). Ранее мы предложили использовать в качестве контрольных образцов при проведении биоинформационного анализа штаммы, геномы которых были секвенированы различными группами авторов, либо штаммы, генетическая близость которых не вызывает сомнений. При этом критерием корректности проведения анализа является попадание «контрольных геномов» в один кластер [7]. В данной работе в качестве таких контролей мы использовали штамм *V. cholerae* O1 81, геном которого секвенирован дважды: на платформе MiSeq (ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт») и платформе IonTorrent (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»). Как видно из дендрограммы, оба контрольных штамма попадают в одну ветку, что свидетельствует о корректности проведения кластерного анализа. Аналогичное распределение получено и для двух других пар контрольных геномов: штамма *V. cholerae* O1 18899 и его изогенного варианта, лишённого гена холерного токсина, и двух относящихся к одному клональному комплексу штаммов *V. cholerae* O1 № 433 и № 434, выделенных из воды реки Агура в 2015 г. (секвенированных в РосНИПЧИ «Микроб» и ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» соответственно на разных платформах).

Использование нового набора SNP-маркеров позволило более достоверно установить родственные связи между токсигенными штаммами O1 (биовара El Tor) и O139 серогрупп, содержащих разные наборы маркеров эпидемического потенциала: аллели генов *ctxB* (*ctxB3*, *ctxB1* или *ctxB7*), *tcpA* (*eltor* или *CIRS*), *rtxA* (*rtxA1*, *rtxA4* или *rtxA4a*), структура острова пандемичности *VSP11* (интактный или содержащий протяженную делецию — *VSP11Δ*). Все



Дендрограмма, построенная на основе SNP-типирования.

A dendrogram based on SNP typing.

они сгруппировались в один большой кластер из двух основных ветвей. Наиболее опасные штаммы с генотипом *ctxB7 tcpA^{CIRS} rtxA4a VSPIIΔ* и близким ему *ctxB1 tcpA^{CIRS} rtxA4 VSPIIΔ* попали в одну ветвь с гаитянскими штаммами и штаммом *CIRS101* из Бангладеш; отдельную группу в этой ветви образовали штаммы *ctxB1 tcpA^{eltor} rtxA1 VSPII* из Ростова-на-Дону, Казани и Дагестана. В то же время другие дагестанские штаммы с таким же генотипом оказались в составе другой ветви, куда отдельной

группой вошли и 4 штамма серогруппы O139, что согласуется с более ранними данными на основе INDEL-типирования [1].

Особый интерес представляют нетоксигенные штаммы, лишенные генов *ctxAB* и не склонные к эпидемическому распространению. Вместе с тем они могут вызывать спорадические случаи и локальные вспышки холероподобной диареи за счет экспрессии ряда детерминант факторов патогенности. Часть из них содержит остров патогенности *VPI-I*, в состав которого входит ген *tcpA*, а некоторые из последних — профаг *preCTX*, их вирулентность показана в опытах *in vivo* [14]. Их происхождение, пути эволюции, а также возможности приобретения генов холерного токсина изучены крайне недостаточно.

По результатам SNP-типирования с использованием другого набора маркеров сотрудниками РосНИПЧИ «Микроб» [15] показано, что штаммы с генотипом *ctxAB⁻tcpA⁺VSPI⁺VSPII⁺* близкородственны токсигенным штаммам. На этом основании авторами было предложено считать их потенциально эпидемически опасными, т.е. способными приобрести профаг *CTX* путем «традиционной» и TSP-зависимой трансдукции и восстановить эпидемический потенциал. В то же время штаммы с генотипом *ctxAB⁻tcpA⁺VSPI⁻VSPII⁻* даже в случае приобретения ими *CTX* эпидемически опасными стать не могут, поскольку на дендрограмме они образовали отдельный удаленный от токсигенных штаммов кластер. Третий отдаленный от обоих указанных кластер был образован штаммами *ctxAB⁻tcpA⁻VSPI⁻VSPII⁻*. Эти данные позволили оценить сходство и различия между штаммами с разными наборами генетических детерминант и проследить пути их эволюции.

Вместе с тем в анализ была включена большая, но все же ограниченная выборка штаммов, и некоторые генотипы оказались за ее пределами. Мы включили в исследование ряд других нетоксигенных штаммов и установили, что они образуют большее число кластеров на дендрограмме и иногда группируются с токсигенными. Например, штаммы *ctxAB⁻tcpA⁺VSPI⁻VSPII⁻*, выделенные из водоемов в Ростове-на-Дону и Калмыкии, попали в один кластер со штаммом *ctxAB⁺tcpA⁺VSPI⁺VSPII⁻V. cholerae* O1 MS6 из Тайланда [16]. При этом один из штаммов, выделенных в Ростовской области, (18963) содержал *preCTX*. Два других штамма *preCTX⁺tcpA⁺VSPI⁻VSPII⁻* сгруппировались со штаммами *preCTX⁻tcpA⁺VSPI⁻VSPII⁻* — представителями клонального комплекса, вызвавшими вспышку заболеваний в Каменском районе Ростовской области в 2005 г. [17].

Еще более гетерогенной группой возбудителей являются штаммы *V. cholerae* nonO1/nonO139, в том числе имеющие гены холерного токсина. Например, именно такими штаммами была вызвана продолжительная вспышка в Узбекистане в 1987–1990 гг.

[18]. Настоящее исследование показало, что узбекский штамм *ctxAB⁺tcpA⁺VSP1-VSP11* (16150) попадает в общий гетерогенный кластер, содержащий *preCTX⁺* и *ctxAB⁺* штаммы *V. cholerae* O1. Ряд других токсигенных штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 (V51, CP1117, 16002) образовали отдаленный от него кластер и оказались ближе к нетоксигенным вариантам *V. cholerae* O1 серогруппы. Штамм V52 *ctxAB⁺tcpA⁺VSP1-VSP11* серогруппы O37 — один из возбудителей крупной эпидемической вспышки в Судане в 1968 г. — оказался близок атоксигенному штамму, выделенному на Гаити в 2012 г.

Очевидно, пути эволюции нетоксигенных штаммов крайне многообразны и требуют отдельного, более детального изучения, чему будет способствовать дальнейшее использование разработанного нами усовершенствованного метода SNP-типирования.

Заклучение

В ходе выполнения настоящей работы разработан метод подбора перечня SNP для проведения филогенетического анализа на основе анализа первичных данных WGS (ридов). Составлен перечень из 3198 «стабильных SNP» для проведения филогенетического анализа. Предложена и апробирована методика использования «контрольных геномов» при проведении кластерного анализа данных WGS. Показана генетическая близость между нетоксигенными штаммами, содержащими ген *tcpA* (*ctxAB⁻tcpA⁺*) и *preCTX*-штаммами *V. cholerae*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Олейников И.П., Мишанькин Б.Н. INDEL-типирование штаммов *Vibrio cholerae*. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2017; 22(4): 195-200.
DOI: <http://doi.org/10.18821/1560-9529-2017-22-4-195-200>
2. Kuleshov K.V., Vodop'yanov S.O., Dedkov V.G., Markelov M.L., Deviatkin A.A., Kruglikov V.D., et al. Travel-associated *Vibrio cholerae* O1 El Tor, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2016; (11): 2006-8.
DOI: <https://dx.doi.org/10.3201/eid2211.151727>.
3. Gardner S.N., Slezak T., Hall B.G. kSNP3.0: SNP detection and phylogenetic analysis of genomes without genome alignment or reference genomes. *Bioinformatics*. 2015; 31: 2877-8.
DOI: <https://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btv271>.
4. Ireng L.M., Ambrose J., Mitangala P.N., Bearzatto B., Kabangwa R.K.S., Durant J.F., Gala J.L. Genomic analysis of pathogenic isolates of *Vibrio cholerae* from eastern Democratic Republic of the Congo (2014–2017). *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2020; 14(4): e0007642.
DOI: <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0007642>.
5. Миронова Л.В., Балахонов С.В. Полногеномный анализ однонуклеотидных полиморфизмов в изучении молекулярной эпидемиологии холеры и эволюционной истории возбудителя. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2014; 4(77):10-8.
6. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maxi-

mum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011; 28: 2731-9.

DOI: <https://dx.doi.org/10.1093/molbev/msr121>.

7. Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Водопьянов С.О., Мишанькин Б.Н., Олейников И.П., Кругликов В.Д., Титова С.В. Молекулярная эпидемиология *Vibrio cholerae* — разработка алгоритма анализа данных полногеномного секвенирования. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2016; 21(3): 146-52.
8. García D.F., Astudillo M. MIRU-VNTR genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* in a population of patients in Cali, Colombia, 2013–2015. *Biomedica*. 2019; 39(s1): 71-85.
DOI: <https://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v39i2.3924>.
9. Shastri A.A., Ahuja K., Ratnaparkhe M.B., Shah A., Gagrani A., Lal A. Vector quantized spectral clustering applied to whole genome sequences of plants. *Evol. Bioinform. Online*. 2019; 15: 1176934319836997.
DOI: <https://dx.doi.org/10.1177/1176934319836997>.
10. Singh R.B., Mahenderakar M.D., Jugran A.K., Singh R.K., Srivastava R.K. Assessing genetic diversity and population structure of sugarcane cultivars, progenitor species and genera using microsatellite (SSR) markers. *Gene*. 2020; 753: 144800.
DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2020.144800>.
11. Subramanian S., Ramasamy U., Chen D. VCF2PopTree: a client-side software to construct population phylogeny from genome-wide SNPs. *PeerJ*. 2019; 7 :e8213.
DOI: <https://dx.doi.org/10.7717/peerj.8213>.
12. Chatterjee S., Rudra S.K., Azmi S.A., Bandyopadhyay R. Phylogenetic study based on 28S rRNA gene sequencing of *Wuchereria bancrofti* isolated from the filaria endemic areas of Bankura district, West Bengal, India. *J. Parasit. Dis.* 2017; 41(4): 981-6.
DOI: <https://dx.doi.org/10.1007/s12639-017-0922-6>.
13. Yokoyama E., Hirai S., Ishige T., Murakami S. Application of whole genome sequence data in analyzing the molecular epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7/H. *Int. J. Food Microbiol.* 2018; 264: 39-45.
DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.019>.
14. Монахова Е.В., Миронова А.В., Алексеева Л.П., Мазрухо А.Б. Вирулентность холерных вибрионов, содержащих *pre-CTXφ*: генотипическая и фенотипическая характеристика. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2008; (4): 27-32.
15. Смирнова Н.И., Кульшань Т.А., Баранихина Е.Ю., Краснов Я.М., Агафонов Д.А., Кутырев В.В. Структура генома и происхождение нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор с различной эпидемиологической значимостью. *Генетика*. 2016; 52(9): 1029-41.
16. Okada K., Roobthaisong A., Swaddiwudhipong W., Hamada S., Chantaroj S. *Vibrio cholerae* O1 isolate with novel genetic background, Thailand–Myanmar. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(6): 1015-7.
DOI: <https://dx.doi.org/10.3201/eid1906.120345>
17. Онищенко Г.Г., Ломов Ю.М., Москвитина Э.А., Подосинникова Л.С., Водяницкая С.Ю., Прометной В.И. и др. Холера, обусловленная *Vibrio cholerae* O1 ctxAB–tcpA+. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2007; (1): 23-9.
18. Онищенко Г.Г., Водопьянов С.О., Ломов Ю.М., Мишанькин Б.Н., Сучков И.Ю., Черепихина И.Я. и др. Холерные вибрионы серогрупп неO1, выделенные в Узбекистане в 1987–1990 гг.: ретроспективный VNTR-анализ. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2003; (6): 25-9.

REFERENCES

1. Vodop'yanov A.S., Vodop'yanov S.O., Oleynikov I.P., Mishan'kin B.N. INDEL-genotyping of *Vibrio cholerae* strains. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 2017; 22(4): 195-200.
DOI: <http://doi.org/10.18821/1560-9529-2017-22-4-195-200> (in Russian)

2. Kuleshov K.V., Vodop'yanov S.O., Dedkov V.G., Markelov M.L., Deviatkin A.A., Kruglikov V.D., et al. Travel-associated *Vibrio cholerae* O1 El Tor, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2016; (11): 2006-8. DOI: <https://dx.doi.org/10.3201/eid2211.151727>.
3. Gardner S.N., Slezak T., Hall B.G. kSNP3.0: SNP detection and phylogenetic analysis of genomes without genome alignment or reference genomes. *Bioinformatics.* 2015; 31: 2877-8. DOI: <https://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btv271>.
4. Ireng L.M., Ambroise J., Mitangala P.N., Bearzatto B., Kabangwa R.K.S., Durant J.F., Gala J.L. Genomic analysis of pathogenic isolates of *Vibrio cholerae* from eastern Democratic Republic of the Congo (2014–2017). *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2020; 14(4): e0007642. DOI: <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0007642>.
5. Mironova L.V., Balakhonov S.V. Whole-genome analysis of single-nucleotide polymorphisms in study of cholera modular epidemiology and agent evolutionary history. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika.* 2014; 4(77): 10-8. (in Russian)
6. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011; 28: 2731-9. DOI: <https://dx.doi.org/10.1093/molbev/msr121>.
7. Vodop'yanov A.S., Pisanov R.V., Vodop'yanov S.O., Mishankin B.N., Oleynikov I.P., Kruglikov V.D., Titova S.V. Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* — development of the algorithm for data analysis of whole genome sequencing. *Epidemiologiya i infektionnyye bolezni.* 2016; 21(3): 146-52. (in Russian)
8. García D.F., Astudillo M. MIRU-VNTR genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* in a population of patients in Cali, Colombia, 2013–2015. *Biomedica.* 2019; 39(s1): 71-85. DOI: <https://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v39i2.3924>.
9. Shastri A.A., Ahuja K., Ratnaparkhe M.B., Shah A., Gagrani A., Lal A. Vector quantized spectral clustering applied to whole genome sequences of plants. *Evol. Bioinform. Online.* 2019; 15: 1176934319836997. DOI: <https://dx.doi.org/10.1177/1176934319836997>.
10. Singh R.B., Mahenderakar M.D., Jugran A.K., Singh R.K., Srivastava R.K. Assessing genetic diversity and population structure of sugarcane cultivars, progenitor species and genera using microsatellite (SSR) markers. *Gene.* 2020; 753: 144800. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2020.144800>.
11. Subramanian S., Ramasamy U., Chen D. VCF2PopTree: a client-side software to construct population phylogeny from genome-wide SNPs. *PeerJ.* 2019; 7 :e8213. DOI: <https://dx.doi.org/10.7717/peerj.8213>.
12. Chatterjee S., Rudra S.K., Azmi S.A., Bandyopadhyay R. Phylogenetic study based on 28S rRNA gene sequencing of *Wuchereria bancrofti* isolated from the filaria endemic areas of Bankura district, West Bengal, India. *J. Parasit. Dis.* 2017; 41(4): 981-6. DOI: <https://dx.doi.org/10.1007/s12639-017-0922-6>.
13. Yokoyama E., Hirai S., Ishige T., Murakami S. Application of whole genome sequence data in analyzing the molecular epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7/H. *Int. J. Food Microbiol.* 2018; 264: 39-45. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.019>.
14. Monakhova E.V., Mironova A.V., Aickscova L.P., Mazrukho A.B. Virulence of pre-ctx9-carrying *Vibrio cholerae*: genotypic and pheno-typic characteristics. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2008; (4): 27-32. (in Russian)
15. Smirnova N.I., Kul'shan' T.A., Baranikhina E.Y., Krasnov Y.M., Agafonov D.A., Kutyrev V.V. Genome structure and origin of nontoxic strains of *Vibrio cholerae* of El Tor biovar with different epidemiological significance. *Russian Journal of Genetics.* 2016; 52(9): 914-25.
16. Okada K., Roobthaisong A., Swaddiwudhipong W., Hamada S., Chantaroj S. *Vibrio cholerae* O1 isolate with novel genetic background, Thailand–Myanmar. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(6): 1015-7. DOI: <https://dx.doi.org/10.3201/eid1906.120345>.
17. Onishchenko G.G., Lomov Yu.M., Moskvitina E.A., L S. Podosinnikova, Vodyanitskaya S.Yu., Prometnoy V.I., et al. Cholera caused by *Vibrio cholerae* O1 ctxAB– tcpA+. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2007; (1): 23-9. (in Russian)
18. Onishchenko G.G., Mishankin B.N., Vodopyanov A.S., Lomov Yu.M., Voronezhskaya L.G., Suchkov I.Yu., et al. Serogroups non-O1 *Vibrio cholerae* isolated in Uzbekistan in 1987–1990: a retrospective VNTR analysis. *Epidemiologiya i infektionnyye bolezni.* 2003; (6): 25-9. (in Russian)

Информация об авторах:

Водопьянов Алексей Сергеевич[✉] — к.м.н., с.н.с. группы вирусологии ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт», 344002, Ростов-на-Дону, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>.
E-mail: alexvod@gmail.com

Писанов Руслан Вячеславович — к.б.н., зав. лаб. диагностики особо опасных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт», 344002, Ростов-на-Дону, Россия.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-7178-8021>.

Водопьянов Сергей Олегович — д.м.н., зав. лаб. биохимии микробов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт», 344002, Ростов-на-Дону, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4336-0439>.

Олейников Игорь Павлович — н.с. лаб. биохимии микробов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт», 344002, Ростов-на-Дону, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2390-9773>.

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Information about the authors:

Alexey S. Vodop'yanov[✉] — PhD (Med.), senior researcher, Virology group, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, 344002, Rostov-on-Don, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>.
E-mail: alexvod@gmail.com

Ruslan V. Pisanov — PhD (Biol.), Head, Department of epidemiology of especially targeted infections, Rostov-on-Don Research Institute for Plague Control, 344019, Rostov-on-Don, Russia.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-7178-8021>.

Sergey O. Vodop'yanov — D. Sci. (Med.), leading researcher, Head, Department of microbial chemistry, Rostov-on-Don Research Institute for Plague Control, 344019, Rostov-on-Don, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4336-0439>.

Igor P. Oleynikov — researcher, Department of microbial chemistry, Rostov-on-Don Research Institute for Plague Control, 344019, Rostov-on-Don, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2390-9773>.

Contribution: the authors contributed equally to this article.

ОБЗОРЫ

© Коллектив авторов, 2020



Значение мембранных фосфолипидов в реализации защитных стратегий бактерий

Андрюков Б.Г.[✉], Ляпун И.Н., Матосова Е.В.

ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова», 690087, Владивосток, Россия

Для сохранения жизнеспособности в стрессовых условиях существования и реализации защитных стратегий бактерии должны воспринимать сигналы и быстро реагировать на экстремальные изменения параметров среды обитания. Результаты недавних экспериментальных исследований дополнили доминировавшую с 1970-х гг. парадигму о преимущественной роли фосфолипидов (ФЛ) как молекулярных строительных блоков для формирования клеточной стенки бактерий. Установлено, что специфические трансформации этих липидных доменов оказывают существенное влияние на форму и функционирование клеток, ремоделирование мембран и способность бактерий адаптироваться к стрессам окружающей среды. Физиологическая роль бактериальных фосфолипидов является плейотропной и определяет целостность и функцию клеток. Помимо ключевой структурной роли мембранных ФЛ в клетке, их промежуточные метаболиты способны выступать в качестве вторичных мессенджеров и играть важные сигнальные и регуляторные роли. Выявлено, что гомеостаз ФЛ имеет решающее значение для патогенеза бактериальных инфекций и необходим не только для поддержания жизнеспособности бактерий, но и для обеспечения их роста в период инфекции, а нарушение биосинтеза этих макромолекул снижает жизнеспособность бактерий. В последние десятилетия одним из главных достижений в концепции модели биологических мембран на основе «жидкой мозаики» стало понимание их доменной структуры. Это открытие представляет фундаментальный и практический интерес, поскольку фосфолипидные домены являются перспективной мишенью современных антимикробных стратегий. Цель настоящего обзора — обобщение современных представлений о структурной, метаболической и сигнальной роли мембранных ФЛ в реализации защитных механизмов бактерий и поддержании их жизнеспособности в неблагоприятных условиях среды обитания.

Ключевые слова: бактериальные фосфолипиды; клеточная стенка; клеточные мембраны; ремоделирование; стрессовая адаптация; стрессовые реакции.

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках государственного задания по теме НИР № 0545-2019-0007 «Молекулярные механизмы образования устойчивых некультивируемых форм бактерий».

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

Для цитирования: Андрюков Б.Г., Ляпун И.Н., Матосова Е.В. Значение мембранных фосфолипидов в реализации защитных стратегий бактерий. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2020; 97(6): 594–603.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-6-10>

Поступила 30.03.2020

Принята в печать 08.07.2020

The role of membrane phospholipids in the implementation of protective strategies of bacteria

Boris G. Andryukov[✉], Irina N. Lyapun, Ekaterina V. Matosova

Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 690087, Vladivostok, Russia

To maintain viability under stressful conditions of existence and the implementation of protective strategies, bacteria must receive signals and respond quickly to extreme changes in environmental parameters. The results of recent experimental studies complement the paradigm that has dominated since the 1970s on the predominant role of phospholipids (PL) as molecular building blocks in the formation of the cell wall of bacteria. Specific transformations of these lipid domains have shown to have a significant effect on the shape and function of cells,

membrane remodeling, and the ability of bacteria to adapt to environmental stresses. The physiological role of bacterial PLs is pleiotropic and determines both cell integrity and cell function. In addition to the key structural role of membrane PL in the cell, their intermediate metabolites are able to act as secondary messengers and perform important signaling and regulatory functions. Modern studies of the mechanisms of detection and integration of signals from the environment that cause stationary-dynamic changes in phospholipid homeostasis and form pleiotropic resistant cellular bacterial phenotypes are of fundamental and practical interest. PL homeostasis was proved to be crucial for the pathogenesis of bacterial infections and is necessary not only to maintain the viability of bacteria, but also to ensure their growth during infection. The suppression of the biosynthesis of these macromolecules reduces the viability of bacteria. In recent decades, one of the main advances in the concept of "liquid mosaic" model of biological membranes has been the understanding of their domain structure. This discovery is of fundamental and practical interest, since phospholipid domains are a promising target for modern antimicrobial strategies. The aim of this review is to summarize modern ideas about the structural, metabolic and signaling role of membrane PL in the implementation of the protective mechanisms of bacteria and maintaining their viability in adverse environmental conditions.

Keywords: *bacterial phospholipids; cell wall; cell membranes; remodeling; stress adaptation; stress reactions.*

Acknowledgments. The work was carried out within the framework of the state assignment on the topic of research work No. 0545-2019-0007 "Molecular mechanisms of the formation of stable uncultivated forms of bacteria".

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

For citation: Andryukov B.G., Lyapun I.N., Matosova E.V. The role of membrane phospholipids in the implementation of protective strategies of bacteria. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii.* 2020; 97(6): 594–603. (In Russ.).
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-6-10>

Received 30 March 2020

Accepted 08 July 2020

Введение

В процессе эволюции микроорганизмы (МО) выработали ряд механизмов, направленных на сохранение жизнеспособности и защиту популяции от неблагоприятных условий существования в диапазоне от адаптационных морфофункциональных изменений биологических свойств до формирования устойчивых (некультивируемых) клеточных фенотипов. Основное значение в обеспечении защитных стратегий бактерий имеет клеточная стенка (КС), представляющая собой сложную гетерогенную систему и определяющая биологические свойства, форму и структурную целостность МО. Она выполняет ряд важнейших физиологических функций, обеспечивающих регуляцию взаимодействия МО с окружающей средой, и является главной мишенью для большей группы антибиотиков [1, 2].

В течение многих десятилетий КС бактерий является предметом научного интереса в связи с ее важностью для большинства прокариот и отсутствием у эукариотических клеток. Кроме того, молекулярные структурные компоненты КС патогенных бактерий играют важную роль в патогенезе инфекционных заболеваний, действуя как адгезины, рецепторы, антигены или эндотоксины [1, 3, 4]. Среди макромолекул бактерий особое значение для обеспечения жизнеспособности в различных условиях среды обитания имеют липиды — активные участники большинства биохимических процессов в клеточных мембранах, представленные в значительной степени фосфолипидами (ФЛ) [2, 3, 5].

Ключевое значение ФЛ для функционирования и выживания бактерий в экстремальных условиях

определяет высокую актуальность их изучения. Кроме того, до настоящего времени остается неисследованной роль этих липидных структур КС в интеграции сигналов среды обитания, механизмов регуляции фосфолипидного гомеостаза [4, 6, 7].

В течение последнего десятилетия (2010–2019 гг.), по данным информационных биомедицинских ресурсов MEDLINE, PubMed, PMC и Cochrane Library, наблюдался растущий научный интерес к исследованию КС бактерий и увеличение числа публикаций (14 810, ключевой запрос «bacterial cell wall»), из которых изучению ФЛ бактерий (ключевой запрос «bacteria phospholipids») было посвящено 10 397 (70,21%) статей. Значительный рост научных исследований был вызван эволюцией научных методов и появлением современных аналитических инструментов для изучения бактериальных ФЛ (твердотельного ядерно-магнитного резонанса, дифференциальной сканирующей калориметрии, масс-спектрометрии и др.) [2, 4–6].

Начало XXI в. ознаменовалось открытием доменной структуры клеточных мембран у прокариот, появлением сведений о значении ФЛ-доменов и липидных рафтов в физиологии бактерий и обеспечении их жизнеспособности в стрессовых условиях. Полученные за последние годы научные данные полностью изменили доминировавшую в конце прошлого века парадигму о преимущественной роли ФЛ как молекулярных строительных блоков мембранного бислоя. Установлено, что эти липидные компоненты КС при стрессорном воздействии среды обитания выступают в качестве вторичных мессенджеров, выполняющих важные сигнальные и регуляторные функции [6, 7].

Однако до настоящего времени истинное биологическое значение мембранных ФЛ в физиологии бактерий и адаптации к стрессу не выяснено [3, 6]. В частности, лишь недавно были получены начальные данные о роли ФЛ в распознавании сигналов из окружающей среды и их влиянии на процессы ремоделирования КС, что может иметь большое значение для разработки новых антимикробных стратегий [6, 8].

Целью данного обзора является обобщение современных представлений о структурной, метаболической и сигнальной роли мембранных ФЛ в реализации защитных механизмов бактерий и поддержании их жизнеспособности в неблагоприятных условиях среды обитания.

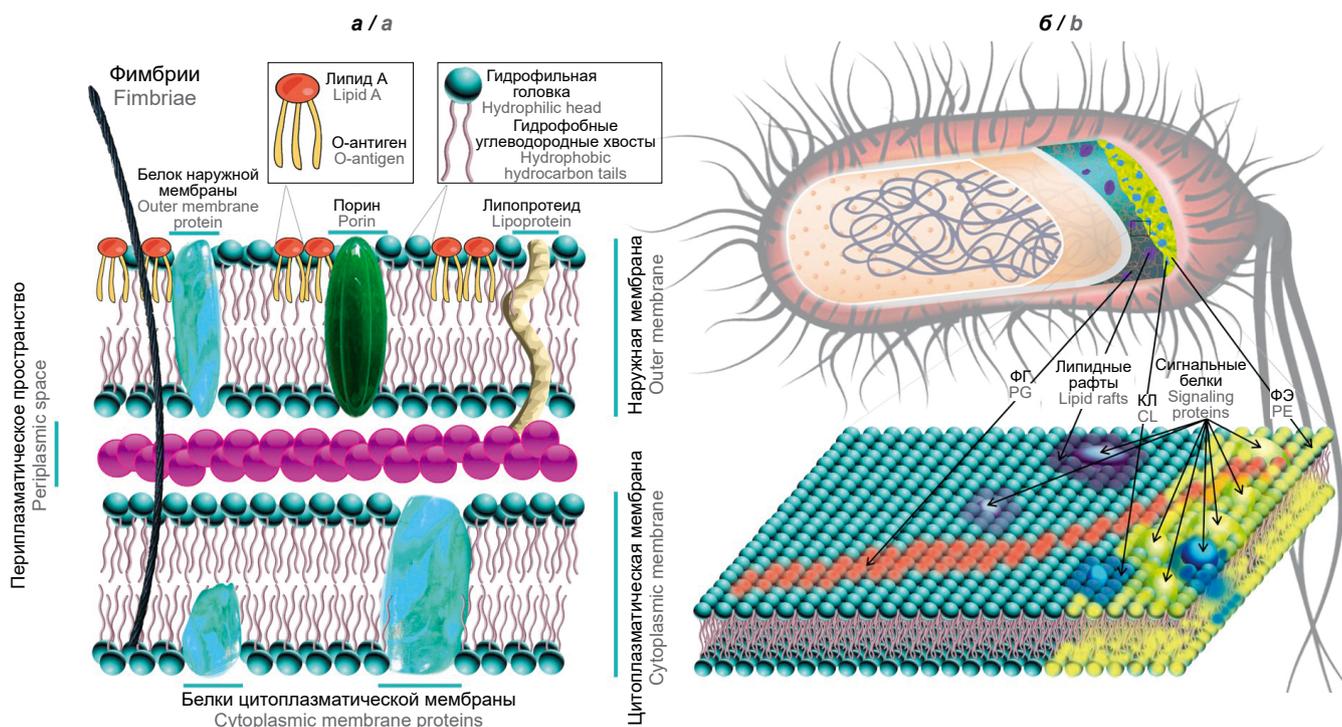
Бактериальные мембраны и клеточные стенки

Бактерии обладают широким спектром адаптационных стратегий, направленных на сохранение жизнеспособности в экстремальных условиях существования, таких как недостаток питательных веществ или воздействие антибиотиков. Следовательно, способность воспринимать сигналы окружающей среды и быстро реагировать на колебания параметров является ключевым фактором выживания бактерий [1, 2, 5]. Механизмы быстрого реаги-

рования на стресс часто требуют значительных физиологических перестроек, включая согласованные трансформации клеточного метаболизма и ремоделирование как цитоплазматической, так и внешней мембраны (у грамотрицательных бактерий). Ключевую роль в реализации этих защитных стратегий играют ФЛ [3, 4, 6].

Раскрытие ведущей роли ФЛ в реакции бактерий на стресс следует начать с произошедшей за последние годы существенной трансформации классической модели строения их биологических мембран и КС [2, 5, 8]. Последние достижения в молекулярной биологии и микробиологической визуализации изменили взгляд на строение бактериальной клетки, а также на структурно-динамическую характеристику клеточной мембраны [4] (рисунок).

В последние годы появилась новая фундаментальная концепция, благодаря которой модель «жидкой мозаики» была расширена и дополнена рядом принципиальных положений. Стало понятно, что сложная архитектура КС и мембран основана на специфической локализации липидных паттернов и макромолекул, и это имеет ключевое значение для сохранения жизнеспособности бактерий. Например, в недавних экспериментальных исследованиях с применением флуоресцентных зондов были



Классическая модель строения мембран грамотрицательных бактерий по S.J. Singer и G.L. Nicolson (a) и современная доменная концепция этой модели (б).

КЛ — кардиолипин; ФГ — фосфатидилглицерин; ФЭ — фосфатидилэтаноламин.

The classical model of the structure of the membranes of gram-negative bacteria according to S.J. Singer and G.L. Nicolson (a) and the modern domain concept of this model (b).

CL — cardiolipin; PE — phosphatidyl-ethanolamine; PG — phosphatidyl-glycerol.

открыты области мембранных фосфолипидных доменов и липидных рафтов, отличающиеся по своим химическим структурам и функциям [6, 8]. Эти открытия сначала были сделаны на клетках эукариот, а в дальнейшем — в мембранах грамотрицательных (G^-) и грамположительных (G^+) бактерий.

В последующих исследованиях было установлено, что эти домены определяют гетерогенность и асимметрию клеточных мембран и имеют решающее значение для обеспечения различных жизненных процессов в бактериях [9]. Полученные за последние годы экспериментальные данные не только изменили и дополнили классическую модель Singer–Nicolson (рисунок, *a*), но и породили новые концепции [9, 10].

Известно, что КС G^- -бактерий устроена более сложно, чем у G^+ -МО, и состоит из наружной и внутренней (цитоплазматической) мембран, а также периплазмы, состоящей из пептидогликана. Большая часть наружной мембраны представлена двойным слоем липидов, основным компонентом которых являются ФЛ [11, 12]. Бимолекулярная природа и амфипатический характер позволяют клеточным мембранам формировать двуслойную структуру, защищающую бактерии от влияния антимикробных агентов, но не препятствующую поступлению необходимых для роста питательных веществ [8, 13, 14].

Другим отличием является то, что оба вида бактерий содержат разные липополисахариды (ЛПС) в своих мембранах. У G^- -бактерий функциональным эквивалентом ЛПС служат липотейхоевые кислоты [2], встроенные в цитоплазматическую мембрану, в то время как у G^- -бактерий ЛПС является основным липидным компонентом внешнего слоя наружной мембраны.

Данное положение полностью соответствует модели Singer–Nicolson, однако экспериментальные данные ограничивают его обоснованность только для стационарных (точнее, стационарно-динамических) состояний клеточных мембран [10, 13]. Проведенные за последние десятилетия исследования позволили установить, что их качественный и количественный состав не является статичным и может значительно трансформироваться в ответ на изменение условий среды обитания [3, 6, 8, 14].

При некоторых состояниях бактериальной клетки, в том числе вызванных экстремальными условиями среды обитания, меняются пространственная организация и ремоделирование мембран с образованием (в результате так называемого мембранного синтеза) временных мембранных однослойных структур при активном мембранно-деформирующем участии ФЛ (наряду с белками) и формированием фосфолипидных доменов кардиолипина (КЛ), фосфатидилглицерина (ФГ) и других липидных кластеров, наделенных специфическими функциями [7, 14, 15]. Например, домены КЛ у *E. coli* в бак-

териальных мембранах на полюсах клеток влияют на полярную локализацию многих белков [15]

Как установили L. Danne с коллегами (2017) на модели G^- -бактерий, при наступлении стрессовых условий культивирования согласованный мембранный синтез происходит внутри как цитоплазматической, так и наружной мембраны [14].

Трансформация пространственной архитектуры и реструктуризация бактериальных мембран стали новыми областями для исследований в молекулярной микробиологии [7, 8, 12, 14]. Согласно современным представлениям, уникальная способность КС прокариот формировать неламинарные однослойные структуры в результате биохимических реакций мембранного синтеза, проходящих внутри клеточных мембран, имеет решающее значение для выживания и адаптации бактерий [3]. При этом ведущая роль в ремоделировании мембраны у бактерий принадлежит качественным и количественным изменениям спектра ФЛ, благодаря чему в последние годы появилось понятие фосфолипидного (липидного) гомеостаза бактерий [11, 16, 17].

Фосфолипидный гомеостаз бактерий

Способность бактерий контролировать и трансформировать гомеостаз ФЛ, как и других жизненно важных соединений, позволяет им обитать в широком диапазоне условий окружающей среды. ФЛ занимают основную и важную часть клеточных мембран, не только обеспечивая их вязкость, механическую прочность и кривизну, но и активно регулируя функции мембранных протеинов, входящих в состав многочисленных рецепторов, ферментов и транспортеров, а также межбелковых взаимодействий [16–18].

Несмотря на значительное разнообразие в клетках прокариот ФЛ-структур, большинство из них являются глицеролипидами, содержащими две цепи жирных кислот. Типичные молекулы ФЛ состоят из обращенной наружу отрицательно заряженной гидрофильной фосфатной головной группы, присоединенной к глицерину, и двух гидрофобных ацильных цепочек-хвостов — неполярных жирных кислот, обращенных внутрь клетки. Подобное расположение амфипатических ФЛ обеспечивает образование плотной физико-химической мембранной структуры, непроницаемой для водорастворимых веществ внеклеточной среды и требуемой для концентрации необходимых для жизнедеятельности молекул в цитоплазме [14, 16, 18]. Кроме того, длина цепи и степень насыщенности жирных кислот, входящих в структуру ФЛ, модулируют толщину и текучесть биомембран [1, 14, 18].

Синтезируемый бактериями спектр ФЛ мажорно представлен фосфатидилэтаноламином (ФЭ), ФГ и дифосфатидилглицерином (КЛ), отличаю-

щимися количеством и длиной ацильных цепей, числом, положением и геометрией ненасыщенных связей, а также структурой, полярностью и зарядом головных частей [2, 6, 14]. Кроме того, для ФЛ-гомеостаза и функционирования бактериальных мембран имеет значение лизофосфатидилэтаноламин (ЛФЭ) — метаболический интермедиат, который образуется при гидролизе ФЭ или дегградации мембран и входит в состав минорных групп ФЛ [11]. При особых условиях (например, при бактериальном стрессе) относительное содержание ЛФЭ может увеличиваться в КС и превышать физиологические следовые концентрации ($\leq 1\%$).

Кроме основных групп, бактерии синтезируют дополнительные, менее распространенные ФЛ, такие как фосфатидилхолин, фосфатидилсерин и фосфатидилинозитол [1]. ФЛ-гомеостаз детерминирован мембранно-белковой архитектурой. Относительное содержание ФЛ варьирует у разных типов (видов) бактерий, а их баланс жестко контролируется, в том числе регуляцией активности ферментов-синтаз, участвующих в биосинтезе. Изменение ФЛ-гомеостаза приводит к нарушению проницаемости клеточных мембран, транспорта белков и электронов, нарушению деления клетки [11].

Для различных видов Гр⁻-бактерий цвиттер-ионный ФЭ является преобладающим ФЛ, в то время как анионные ФГ и КЛ больше распространены у Гр⁺-МО [5]. Установлено (на модели *E. coli*), что мембраны Гр⁻-бактерий состоят примерно из 70–75% ФЭ, 20–25% ФГ и 0–10% КЛ [13, 19]. Это соотношение является относительно постоянным, за исключением периода перехода клеток в стационарную фазу роста, а также случаев, когда увеличивается содержание КЛ [10, 12, 15]. Перечисленные ФЛ совместно с ЛПС составляют липидный кластер, входящий в сложную макромолекулярную структуру, которая является барьером проницаемости и защитой бактериальной клетки от влияния экстремальных условий, а также создает избирательную проницаемость для веществ, необходимых для жизнеобеспечения бактерий [8, 20].

В отличие от ЛПС, большая часть которых находится в составе внешней мембраны (основной компонент), ФЛ входят в состав как внешней, так и внутренней мембраны (вместе с α -спиральными белками). Здесь они составляют более 95% липидов, инициируя сигнальные каскады биохимических реакций при бактериальном стрессе [8, 12, 14].

Липидный гомеостаз мембран, который имеет важное значение для сохранения жизнеспособности бактерий, обеспечивается скоординированными процессами транспорта и синтеза. В отличие от ЛПС, синтез которых изучен достаточно хорошо, механизмы сборки ФЛ исследованы в меньшей степени [9, 11, 12]. При этом большая часть исследований проводилась на основной биологической

модели — *E. coli*, а полученные результаты интерполировались на все Гр⁻-бактерии (у Гр⁺-МО синтез имеет некоторые отличия) [13].

У бактерий, как и у всех организмов, биосинтез ФЛ начинается с ацилирования глицерол-3-фосфата с образованием фосфатидной кислоты. Она является ключевым предшественником образования основных ФЛ у бактерий. В дальнейшем фосфатидная кислота превращается в цитидин-дифосфат-диацилглицерид (CDP-DAG) с участием фермента CDP-диглицерид-синтазы (CdsA). CDP-DAG является предшественником основного ион-биполярного фосфолипида — ФЭ и конечных анионных фосфолипидов — ФГ и КЛ. Дифосфатидилглицерин (КЛ) образуется в результате конденсации двух молекул ФГ [5, 13, 14]. Все реакции синтеза ФЛ происходят на цитоплазматической мембране, и все ключевые интермедиаты, такие как фосфатидная кислота и CDP-DAG, также связаны с мембраной [5, 13, 14, 18].

Биосинтез ФЛ, имеющий важное значение не только для сохранения жизнеспособности бактерий, но и для поддержания их роста в период инфекции, в последние годы стал одним из перспективных направлений поиска новых антимикробных мишеней. Помимо ключевой структурной роли этих липидных доменов в клетке промежуточные метаболиты ФЛ могут выступать в качестве вторичных мессенджеров и выполнять важные регуляторные функции [8, 21, 22].

Двуслойная мембранная архитектура не только обеспечивает механическую прочность и целостность бактериальных клеток, но и влияет на топологию мембранных белков, функция которых имеет выраженную ФЛ-зависимость [9, 14]. Она опосредована, с одной стороны, связывающим действием ФЛ, играющих роль «гидрофобного клея» для белковых молекул (например, КЛ стабилизирует комплексы транслокационных белков SecYEG) [4, 13, 16], а с другой — наличием связанных ФЛ-компонентов в структуре многих мембранных белков [21, 23].

Это связано не только с их особой ролью в блок-ФЛ-опосредованном ремоделировании клеточных мембран, но и с модуляцией функций мембранных белков, многие из которых имеют ФЛ в своей структуре [21, 23]. Белок-ФЛ-связи обеспечиваются гидрофобными взаимодействиями (например, интегральная мембранно-натриевая антипортёрная структура с молекулой ФЭ в составе) [14] или посредством зарядовых взаимодействий (например, мембранно-интегральный носитель митохондриального аденозинтрифосфата, имеющий в составе КЛ) [9, 24].

Таким образом, за десятилетия изучения липидных доменов бактерий накопилось достаточно много информации о химических и физических

Данные о функциях и участии ФЛ в жизнеобеспечении бактериальных клеток, полученные на основе молекулярно-генетической трансформации генов, кодирующих биосинтез ФЛ

Information on the functions and participation of phospholipids in the life support of bacterial cells obtained on the basis of molecular genetic manipulation

Генетическая трансформация Genetic manipulation	ФЛ Phospholipids	Основные функции в клетке Main functions in the cell	Источники Sources
+ <i>pssA</i>	ФЭ Phosphatidyl-ethanolamine	Обеспечивает целостность мембран, поверхностный и электрохимический потенциал, гидрофобность; чувствительность к внутриклеточному подкислению Provides membrane integrity, surface and electrochemical potential, hydrophobicity; sensitivity to intracellular acidification	[19]
Δ <i>pssA</i>	ФЭ Phosphatidyl-ethanolamine	Отсутствие проявляется дефектами клеточного деления, энергетического обмена и нарушением структурной организации. Нарушение подвижности бактерий и хемотаксиса. Нарушение функции вторичных транспортеров (сахаров и аминокислот) Its absence is manifested by defects in cell division, energy metabolism and a violation of structural organization. Impaired motility of bacteria and chemotaxis. Dysfunction of secondary transporters (sugars and amino acids)	[20, 25, 26]
Δ <i>psd</i>	ФЭ Phosphatidyl-ethanolamine	Отсутствие приводит к модуляции температурной чувствительности, нарушению целостности КС и мембран, авирулентности (мыши) Its absence leads to modulation of temperature sensitivity, to disruption of the integrity of the cell wall and membranes, and avirulence (in mice)	[8]
Δ <i>pgsA</i>	ФГ и КЛ Phosphatidyl-glycerol and cardiolipin	Отсутствие вызывает нарушение синтеза белка наружной мембраны, деления клеток, энергетического обмена и осмотической регуляции, снижению жизнеспособности бактерий. Нарушение синтеза приводит к термочувствительному дефекту роста при 42°C Its absence causes a disturbance in the synthesis of the outer membrane protein, cell division, energy metabolism and osmotic regulation, and a decrease in bacterial viability. Suppression of the synthesis leads to a heat-sensitive growth defect at 42°C	[14, 24]
+ <i>pssA</i>	Фосфатидилсерин Phosphatidylserine	Повышает толерантность к промышленным ингибиторам синтеза ФЛ Increases tolerance to industrial inhibitors of phospholipid synthesis	[19]
Δ <i>clsA</i>	КЛ Cardiolipin	Выявлено участие в модуляции активности и кодировании КЛ-синтазы и дегидрогеназы, а также регуляции скорости окислительного фосфорилирования и ремоделирования мембран. Потеря жизнеспособности после длительной инкубации в стационарной фазе роста Participation in the modulation of activity and coding of cardiolipin synthase and dehydrogenase, as well as the regulation of the rate of oxidative phosphorylation and remodeling of membranes. Loss of viability after prolonged incubation in the stationary growth phase	[20, 22]
+ <i>clsA</i>	КЛ Cardiolipin	Снижение мембранного потенциала, возможная потеря жизнеспособности, нарушение барьерной функции КС Decreased membrane potential, possible loss of viability, impaired barrier function of the cell wall	[20, 22]
Δ <i>clsBC</i>	КЛ Cardiolipin	Уменьшает длину бактериальной клетки на 20% и снижает биосинтез липида II на 20%. Повышает чувствительность бактерий к антибиотикам Reduces bacterial cell length by 20% and reduces lipid II biosynthesis by 20%. Increases bacteria sensitivity to antibiotics	[23, 24]

Примечание. (+) — повышенная экспрессия генов; Δ — низкая экспрессия генов (нокауты).

Note. (+) — hybrid models; Δ — knockouts (mutants).

свойствах, а также о структурном разнообразии клеточных ФЛ и механизмах, контролируемых динамическое постоянство состава клеточных мембран. Однако до последнего времени не было исследовано, каким образом эти свойства опосредуют биологические функции ФЛ. Кроме того, были неизвестны роль и значение каждого из них для физиологии, жизнеспособности или целостности бактериальной клетки. Эти исследования стали доступны после использования молекулярно-генетических подходов.

Молекулярно-генетические подходы, направленные на целевое модулирование биосинтеза фосфолипидов

Быстрое развитие молекулярной генетики с середины 1970-х гг. позволило разработать первые рекомбинантные штаммы *E. coli*, которая является наиболее распространенной модельной системой для изучения функции ФЛ. Трансформация спектра бактериальных фосфолипидов (ФЭ, ФГ, КЛ, фосфатидилсерина и фосфатидилхолина) достигалась

путем создания нулевых мутантов соответствующих генов, кодирующих мембранные ферменты, катализирующие ключевые реакции биосинтеза ФЛ [20, 23, 25]. Целью этих исследований было решение вопроса о функциях или необходимости специфических ФЛ для сохранения жизнеспособности бактерий в неблагоприятных условиях среды обитания, в том числе в результате воздействия антибиотиков [20, 22, 24].

История изучения бактериального метаболизма ФЛ и роли отдельных липидных кластеров для жизнедеятельности клеток является удачным примером соединения энзимологии и генетики. Это сотрудничество наиболее плодотворно проявилось в конце XX в. в группах исследователей во главе с А. Kornberg и Е. Kennedy [20].

Систематическая генетическая трансформация спектров ФЛ бактериальных клеток путем нацеливания на гены, кодирующие ферменты биосинтеза ФЛ, позволила проверить их функцию *in vivo* и выявить новые роли в жизнеобеспечении бактерий на молекулярном уровне (таблица) [20, 25, 26].

Для исследования специфической реакции бактериальной клетки на стресс в условиях дефицита целевых ФЛ авторы применили анализ репортерных генов для дозозависимых характеристик, вестерн-блоты и измерения вторичных мессенджеров для выявления численности и активности ключевых регуляторов [20, 24]. Полученные данные свидетельствуют о том, что ФЭ- и КЛ-дефицитные клетки активируют различные молекулярно-морфологические механизмы стрессового ответа [22, 24, 25].

Z.D. Dalebroux с коллегами, изучая реакцию на стресс *E. coli* в модельных условиях дефицита ФЭ, обнаружили значительные изменения в морфологии и структуре КС, сокращение длины цепи антигена О, снижение мембранного потенциала, метаболической активности и гиперспособности к формированию биопленки по сравнению с контрольным штаммом [7]. Установлено, что дефицит или удаление ФЭ вызывали плейотропное действие, выраженность которого зависела от экспрессии гена *pssA*, кодирующего синтез фосфатидилсеринсинтазы, катализирующей синтез этого ФЛ [7, 20].

В последующих исследованиях установлено, что синтез КЛ у бактерий является сложным процессом, зависящим от трех изоформ КЛ-синтазы (ClsABC), которые катализируют продукцию КЛ в стационарной фазе [11]. В условиях дефицита этого ФЛ у *E. coli* при реакции на стресс происходят морфофизиологические трансформации в клетке, однако у этих мутантов выявлена более длинная цепь антигена О, которая восстанавливалась после индукции гена *clsA*, кодирующего синтез КЛ-синтазы, а также (в отличие от дефицита ФЭ) снижение спо-

собности к формированию биопленки, устойчивости к воздействию перекиси водорода и щелочной рН, осмотическому стрессу и органическим растворителям [11, 20]. Кроме того, дефицит КЛ приводил к нарушению организации и активности мембранных белков, участвующих в окислительном фосфорилировании у бактерий [12].

Появление новых сведений о специфических мембранных функциях ФЛ произошло благодаря формированию единого комплексного подхода к изучению их роли в физиологии бактерий [8]. Результаты использования молекулярно-генетических подходов и методов микробиологической визуализации, полученные в последние годы, позволили установить, что нарушение ФЛ-гомеостаза приводит к выраженным изменениям макромолекулярного состава бактериальных клеток, сопровождаемым эндогенным стрессом и выраженным плейотропным клеточным эффектом [20, 26]. Кроме того, комплексное изучение ФЛ-зависимой бактериальной адаптации выявило важность липидного состава бактериальных мембран для поддержания формы и размера клеток, а также их связь с метаболизмом при экзогенном стрессе [8, 20, 27].

Эти ФЛ-зависимые эффекты включают не только изменения мембранных транспортно-синтетических путей, но и, как показало изучение генетически измененных штаммов, замедление скорости биосинтеза мембран, нарушение клеточной адгезии [20, 26].

Например, экспериментальные исследования Е. Mileykovskaya с коллегами на изолятах с нокаутрованными генами $\Delta pssA$ и $\Delta clsA$ показали, что у бактериальных клеток, лишенных ФЭ или КЛ, происходило увеличение гетерогенности размеров и полиморфности в условиях сниженной доступности питательных веществ [24]. Кроме того, нарушение ФЛ-гомеостаза приводило к нарушению формирования биопленки, реализации множественных путей защитных стратегий против внешних стрессов окружающей среды, повышению чувствительности к антимикробным веществам [20, 24].

В другом исследовании D.K. Giles с коллегами установили, что когда клетки Гр⁻-возбудителя холеры *Vibrio cholerae* подвергались воздействию желчи, у них наблюдалось сопутствующее изменение уровней ФЭ (снижение) и КЛ (увеличение) с последующим ремоделированием клеточных мембран [26]. Аналогичные мембранные трансформации происходят и у других Гр⁻-патогенов при взаимодействии с иммунной системой макроорганизма или при воздействии антимикробных веществ [20].

V.W. Rowlett с коллегами установили, что механизм, побуждающий к началу изменения ФЛ-гомеостаза у бактерий и последующей мембранной реструктуризации, связан с активацией двухкомпонентных систем PhoPQ и PmrAB, реагирующих

на внешние стрессоры и запускающих экспрессию соответствующих генов [8]. В недавнем исследовании, проведенном авторами, было показано, что при нарушении синтеза мембранных ФЛ активация PhoPQ в стрессовых условиях не происходит, бактериальные клетки теряют способность к ремоделированию мембран и реализации многочисленных механизмов ответа на стресс [8].

Фосфолипидные домены клеточных мембран и классическая модель «жидкой мозаики»

В последние годы появилась новая фундаментальная концепция, уточняющая классическую молекулярную флюидно-мозаичную модель («жидкой мозаики») клеточных структур (Singer–Nicolson), которая была предложена около полувека назад [4]. Эта старая, но остающаяся в силе модель основана на постулате о диффузионной подвижности и равномерном распределении в однородной клеточной мембране двойного липидного слоя, являющегося «морем липидов» с плавающими в нем белками [2, 4] (рисунок, а).

В начале XXI в. эта модель была расширена и дополнена рядом принципиальных положений. Установлено, что сложная архитектура КС и мембран не является «морем липидов», а основана на специфической локализации высокоуровневых макромолекулярных доменов, обеспечивающих многие клеточные функции, имеющие ключевое значение для сохранения жизнеспособности бактерий [3, 6, 22] (рисунок, б).

Например, в экспериментальных исследованиях с применением флюоресцентных зондов были открыты области мембранных ФЛ-доменов, отличающихся по своему липидному составу (липидные домены) [6, 20, 25], и рафты (плоты) [28], различные по физическим характеристикам (отрицательной или положительной кривизне) [27] или электрическому потенциалу [26]. Эти исследования показали важнейшую роль ФЛ-доменов для клеток и поставили под сомнение флюидно-мозаичную модель Singer–Nicolson сначала для эукариотических [22, 24], а позднее — для бактериальных клеток, где эти домены играют роль мишеней для специфической локализации белковых комплексов [11, 15, 29].

Современные исследования [15, 18, 22] с использованием масс-спектрометрии и тандемной масс-спектрометрии на моделях *E. coli*, *P. aeruginosa* и *B. subtilis* показали, что ФЛ-состав бактериальных мембран может резко изменяться в процессе жизненного цикла бактерий. Как показали исследования, проведенные с помощью мембранных модельных систем и гидрофобного флюоресцентного красителя 10-N-ноналакридинового оранжевого, расположение в бактериальных мембранах КЛ-доменов неравномерно — преимущественно в

полярных и перегородочных областях, что обеспечивает выполнение ими специфических функций [19, 20, 25].

При воздействии на бактерии аминокликозидов происходило перемещение и кластеризация КЛ-доменов без изменения текучести мембран. При этом реализовались функции, контролируемые КЛ: ингибирование дыхательной цепи и изменения формы бактерий (уменьшение длины и увеличение кривизны) [21, 23, 24]. Эти результаты представляют большой интерес для разработки новых перспективных антимикробных стратегий, нацеленных на ингибирование синтеза КЛ.

При исследовании доменов ФГ в основном использовались ФЛ-специфические катионные красители серии FM (FM4-64, FM1-43 и FM5-95), которые локализовались в спиральных липидных структурах клеточной мембраны в клетках *B. subtilis*, где индуцировалась экспрессия гена *pgsA* [6, 11, 20]. Выявлено, что преимущественная локализация ФГ в спиральных структурах *B. subtilis* сопровождалась увеличением концентрации в этих паттернах и ключевых белков клеточного деления FtsA и FtsZ [6].

Эти открытия побудили исследовать локализацию ФЭ с циклическим пептидным зондом Ro09-0198, который специфически связывается с этими ФЛ [1, 8, 9]. Обработка биотинилированным Ro09-0198 с последующим конъюгированным с тетраметил-родамином стрептавидином показала, что ФЭ-домены локализуются в перегородочных мембранах вегетативных клеток *E. coli*, а также в мембранах полярной перегородки и оболочечных мембранах спорующих клеток *B. subtilis*. В этих же клеточных паттернах локализовались и большинство фосфатидилсеринсинтаз, катализирующих синтез данных ФЛ [28, 30].

Важной особенностью современной концепции строения клеточной мембраны стало открытие липидных рафтов (плотов) — микродоменов — локализации вокруг определенных сигнальных белков определенных видов липидов. Эти кластеры липидного бислоя, вкрапленные на поверхности ФЛ, были в начале XXI в. обнаружены в эукариотических клетках (что было расценено как эволюция клеточной сложности), где определены их сигнальные функции. В последующие годы эквивалентные микродомены выявлены и в бактериальных клетках [25, 27].

Используя метод жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрическим анализом, исследователи обнаружили у *B. subtilis* функциональную скваленсинтазу YisP, кодируемую геном *yisp*. Дальнейшие исследования показали, что функциональные липидные рафты в бактериальных мембранах, как и в эукариотических, координируют клеточные сигнальные пути секреции белков и их транспорта, обеспечивая адаптационные реакции и жизнеспособность МО [25, 29]. Кроме того, обнару-

жено, что некоторые патогенные бактерии выработали ряд механизмов использования липидных рафтов для проникновения в клетки макроорганизмов и индукции инфекционных заболеваний [27, 28].

Открытие рафтов в составе мембран позволило по-новому взглянуть на известную проблему современной мембранологии — зависимость функционирования мембранных белков от липидного состава мембран, сбалансированного таким образом, чтобы создать необходимые условия для корректной и эффективной работы мембранных белков. Высокое содержание сигнальных белков в рафтовой зоне свидетельствует об их участии в регуляции мембранных процессов [27].

Таким образом, благодаря современным аналитическим технологиям было установлено, что многие макромолекулы в бактериальных клетках имеют специфическую локализацию. В частности, наличие определенных мембранных ФЛ-доменов является важным дополнением существующей классической модели «жидкой мозаики». Изучение значения этих кластеров для жизнеспособности бактериальных клеток еще не закончено, но уже установлено, что эти домены и рафты играют ведущую роль в обеспечении важнейших клеточных процессов, включая деление, передачу сигналов, споруляцию, включение адаптивных реакций на внешние стрессоры и др.

Фосфолипидные домены и современные антимикробные стратегии

Бактериальные мембраны представляют собой основной барьер, защищающий внутриклеточные структуры от антимикробных агентов, и поэтому являются главными мишенями в механизмах токсического действия многих антибиотиков [1, 2, 8]. Их воздействие направлено на повреждение или разрушение бактериальных мембран, что является следствием нарушения организации липидного бислоя [28, 30].

Однако в последние десятилетия увеличивающаяся антибиотикорезистентность патогенных МО все чаще снижает эффективность проводимого этиологического лечения бактериальных инфекций и стимулирует разработку альтернативных антибактериальных технологий [23].

Недавно была предложена новая антимикробная стратегия, связанная с использованием антимикробных поликатионных агентов, специфический механизм действия которых направлен на разделение анионных липидных кластеров. Это приводит к образованию в мембране сквозных дефектов (пор) в результате замедления диффузных процессов и фазового перехода в области ФЛ-доменов и липидных рафтов, а также их последующей сегрегации [28, 29].

Указанные трансформации вызывают, с одной стороны, повышение проницаемости мембран для

антимикробных агентов и дестабилизацию структуры бислоя, а с другой стороны, разрушение липидных макромолекул, что снижает жизнеспособность бактерий [28]. В качестве перспективных поликатионных агентов в последние годы изучается использование некоторых антимикробных пептидов [29].

Заключение

Обобщая полученные данные, можно сделать вывод, что ФЛ-гомеостаз имеет ключевое значение для жизнеобеспечения сложной системы адаптации МО, управления механизмами ремоделирования клеточных мембран. В последние десятилетия одним из главных достижений в концепции модели биологических мембран на основе «жидкой мозаики» стало понимание их доменной структуры. В свете новой концепции все большее внимание уделяется изучению ФЛ-кластеров бактериальных мембран, что имеет фундаментальное и практическое значение.

Дальнейшие исследования механизмов обнаружения и интегрирования сигналов из окружающей среды определяются важностью эффективного функционирования ФЛ-доменов, и раскроют патогенетический механизм многих заболеваний: атеросклероза, рака, диабета, болезни Альцгеймера и др.

Новые представления о непосредственном и активном участии мембранных ФЛ в реализации защитных стратегий бактериальной клетки имеют важное значение для последующей разработки новых мишеней — ФЛ-доменов — для антимикробной терапии в условиях угрожающего роста резистентности МО к традиционным антибиотикам. Современные инновационные стратегии нацелены на анионные ФЛ-домены с помощью некоторых катионных антимикробных пептидов, которые нарушают их стабильность и снижают жизнеспособность бактерий.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Sohlenkamp C., Geiger O. Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiol. Rev.* 2016; 40(1): 133–59. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv008>
2. Dörr T., Moynihan P.J., Mayer C. Editorial: bacterial cell wall structure and dynamics. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 2051. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02051>
3. Abellón-Ruiz J., Kaptan S.S., Baslé A., Claudi B., Bumann D., Kleinekathöfer U., et al. Structural basis for maintenance of bacterial outer membrane lipid asymmetry. *Nat. Microbiol.* 2017; 2(12): 1616–23. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0046-x>
4. Nicolson G.L. The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014; 1838(6): 1451–66. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.10.019>
5. Slavetinsky C., Kuhn S., Peschel A. Bacterial aminoacyl phospholipids – biosynthesis and role in basic cellular processes and pathogenicity. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids.* 2017; 1862(11): 1310–8. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.11.013>
6. Barák I., Muchová K. The role of lipid domains in bacterial cell processes. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14(2): 4050–65. <https://doi.org/10.3390/ijms14024050>

7. Dalebroux Z.D. Cues from the membrane: bacterial glycerophospholipids. *J. Bacteriol.* 2017; 199(13): e00136-17. <https://doi.org/10.1128/JB.00136-17>
8. Rowlett V.W., Mallampalli V.K.P.S., Karlstaedt A., Dowhan W., Taegtmeier H., Margolin W., et al. Impact of membrane phospholipid alterations in *Escherichia coli* on cellular function and bacterial stress adaptation. *J. Bacteriol.* 2017; 199(13): e00849-16. <https://doi.org/10.1128/JB.00849-16>
9. Vitrac H., Mallampalli V.K.P.S., Dowhan W. Importance of phosphorylation/dephosphorylation cycles on lipid-dependent modulation of membrane protein topology by posttranslational phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 2019; 294(49): 18853–62. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010785>
10. Bishop R.E. Phospholipid middle management. *Nat. Microbiol.* 2019; 4(10): 1608–9. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0570-y>
11. Sastre D.E., Basso L.G.M., Trastoy B., Cifuentes J.O., Contreras X., Gueiros-Filho F., et al. Membrane fluidity adjusts the insertion of the transacylase PlsX to regulate phospholipid biosynthesis in Gram-positive bacteria. *J. Biol. Chem.* 2020; 295(7): 2136–47. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011122>
12. Exterkate M., Caforio A., Stuart M.C.A., Driessen A.J.M. Growing membranes in vitro by continuous phospholipid biosynthesis from free fatty acids. *ACS Synth. Biol.* 2018; 7(1): 153–65. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00265>
13. Tang Y., Xia H., Li D. Membrane phospholipid biosynthesis in bacteria. In: Cao Y., eds. *Advances in Membrane Proteins*. Singapore: Springer; 2018: 77–119. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0532-0_4
14. Danne L., Aktas M., Unger A., Linke W.A., Erdmann R., Narberhaus F. Membrane remodeling by a bacterial phospholipid-methylating enzyme. *mBio.* 2017; 8(1): e02082-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.02082-16>
15. Parsons J.B., Rock C.O. Bacterial lipids: metabolism and membrane homeostasis. *Prog. Lipid Res.* 2013; 52(3): 249–76. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.02.002>
16. Shrivastava R., Jiang X., Chng S.S. Outer membrane lipid homeostasis via retrograde phospholipid transport in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 2017; 106(3): 395–408. <https://doi.org/10.1111/mmi.13772>
17. Coleman G.A., Pancost R.D., Williams T.A. Investigating the origins of membrane phospholipid biosynthesis genes using outgroup-free rooting. *Genome Biol. Evol.* 2019; 11(3): 883–98. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz034>
18. Tan Z., Khakbaz P., Chen Y., Lombardo J., Yoon J.M., Shanks J.V., et al. Engineering *Escherichia coli* membrane phospholipid head distribution improves tolerance and production of biorenewables. *Metab. Eng.* 2017; 44: 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017>
19. Dowhan W. Understanding phospholipid function: why are there so many lipids? *J. Biol. Chem.* 2017; 292(26): 10755–66. <https://doi.org/10.1074/jbc.X117.794891>
20. Robertson R.M., Yao J., Gajewski S., Kumar G., Martin E.W., Rock C.O., et al. A two-helix motif positions the active site of lysophosphatidic acid acyltransferase for catalysis within the membrane bilayer. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2017; 24(8): 666–71. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3436>
21. Lin T.Y., Gross W.S., Auer G.K., Weibel D.B. Cardiolipin alters *Rhodobacter sphaeroides* cell shape by affecting peptidoglycan precursor biosynthesis. *mBio.* 2019; 10(1): e02401-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.02401-18>
22. Tan B.K., Bogdanov M., Zhao J., Dowhan W., Raetz C.R.H., Guan Z. Discovery of a novel cardiolipin synthase in *Escherichia coli* utilizing phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol as substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012; 109(41): 16504–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212797109>
23. El Khoury M., Swain J., Sautrey G., Zimmermann L., Van Der Smitten P., Décout J.L., et al. Targeting bacterial cardiolipin enriched microdomains: an antimicrobial strategy used by amphiphilic aminoglycoside antibiotics. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 10697. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10543-3>
24. Mileykovskaya E., Ryan A.C., Mo X., Lin C.C., Khalaf K.I., Dowhan W., et al. Phosphatidic acid and N-acylphosphatidylethanolamine form membrane domains in *Escherichia coli* mutant lacking cardiolipin and phosphatidylglycerol. *J. Biol. Chem.* 2009; 284(5): 2990–3000. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805189200>
25. Pogmore A.R., Seistrup K.H., Strahl H. The Gram-positive model organism *Bacillus subtilis* does not form microscopically detectable cardiolipin-specific lipid domains. *Microbiology.* 2018; 164(4): 475–82. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000639>
26. Giles D.K., Hankins J.V., Guan Z., Trent M.S. Remodelling of the *Vibrio cholerae* membrane by incorporation of exogenous fatty acids from host and aquatic environments. *Mol. Microbiol.* 2011; 79(3): 716–28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07476.x>
27. Bramkamp M., Lopez D. Exploring the existence of lipid rafts in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2015; 79(1): 81–100. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00036-14>
28. Epan R.M., Epan R.F. Lipid domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009; 1788(1): 289–94. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.08.023>
29. Matsuzaki K., ed. *Antimicrobial Peptides: Basics for Clinical Application*. Kyoto: Springer; 2019.
30. Ursell T.S., Klug W.S., Phillips R. Morphology and interaction between lipid domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009; 106(32): 13301–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903825106>

Информация об авторах

Андрюков Борис Георгиевич[✉] — д.м.н., в.н.с. лаб. молекулярной микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, 690087, Владивосток, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4456-808X>. E-mail: andrukov_bg@mail.ru

Ляпун Ирина Николаевна — к.б.н., с.н.с. лаб. молекулярной микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, 690087, Владивосток, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5290-3864>. E-mail: irina-lyapun@list.ru

Матосова Екатерина Владимировна — м.н.с. лаб. молекулярной микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, 690087, Владивосток, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9968-3347>. E-mail: e_matosova@mail.ru

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Information about the authors

Boris G. Andrukov[✉] — D. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of molecular microbiology, Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 690087, Vladivostok, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4456-808X>. E-mail: andrukov_bg@mail.ru

Irina N. Lyapun — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of molecular microbiology, Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 690087, Vladivostok, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5290-3864>. E-mail: irina-lyapun@list.ru

Ekaterina V. Matosova — junior researcher, Laboratory of molecular microbiology, Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 690087, Vladivostok, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9968-3347>. E-mail: e_matosova@mail.ru

Contribution: the authors contributed equally to this article.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

© Гольдштейн Э.М., 2020



Факторы, влияющие на смертность от новой коронавирусной инфекции в разных субъектах Российской Федерации

Э.М. Гольдштейн[✉]

Гарвардская школа общественного здравоохранения, Бостон, США

Актуальность. Влияние таких факторов, как плотность населения, практика тестирования на SARS-CoV-2 (в совокупности с самоизоляцией/карантином для инфицированных и контактных лиц) и температура воздуха, на распространение и смертность от COVID-19 в разных субъектах РФ недостаточно изучено.

Материалы и методы. Плотность населения в разных субъектах РФ оценивается как количество населения на 1 км² земли населенных пунктов; температура оценивается как среднее между температурами в январе и июле; практика тестирования на SARS-CoV-2 оценивается через коэффициент летальности (процент летальных случаев среди всех выявленных случаев COVID-19 с известным исходом (выздоровевших + умерших)) — при более активном тестировании выявляется больше случаев заболевания COVID-19 в легкой и средней форме и коэффициент летальности уменьшается, т.е. коэффициент летальности находится в обратной зависимости от активности тестирования.

Результаты. Корреляция между плотностью населения и уровнем смертности от COVID-19 на 100 тыс. человек в 85 субъектах РФ на 22.11.2020 г. равна 0,53 (0,36; 0,67); корреляция между коэффициентом летальности и уровнем смертности — 0,62 (0,47; 0,74). Результаты линейной регрессии говорят о том, что плотность населения и коэффициент летальности положительно связаны с уровнем смертности от COVID-19 на 100 тыс. человек, а температура воздуха отрицательно связана с уровнем смертности от COVID-19 в 85 субъектах РФ.

Выводы. Более низкая плотность населения, более активное тестирование на SARS-CoV-2 и более высокая температура воздуха способствуют понижению уровня смертности от COVID-19 в разных субъектах РФ. В частности, следует принимать дополнительные меры для повышения уровня тестирования на SARS-CoV-2 среди разных категорий лиц, включая лиц, которые хотят тестироваться по собственной инициативе, лиц, обращающихся за медицинской помощью с симптомами ОРВИ, и контактных лиц для подтвержденных случаев COVID-19.

Ключевые слова: новая коронавирусная инфекция; смертность; плотность населения; коэффициент летальности; температура воздуха; тестирование; субъекты Российской Федерации.

Источник финансирования. Автор заявляет об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Гольдштейн Э.М. Факторы, влияющие на смертность от новой коронавирусной инфекции в разных субъектах Российской Федерации. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2020; 97(6): 604–607.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-6-11>

Поступила 26.11.2020

Принята в печать 10.12.2020

Factors affecting mortality for the novel coronavirus infection in different regions of the Russian Federation

Edward M. Goldstein[✉]

Harvard T.H. Chan School of Public Health, Boston, United States

Background. The influence of such factors as population density, practices for testing for the SARS-CoV-2 (combined with quarantine/self-isolation for infected individuals and their contacts) and ambient temperature

on the spread of the novel coronavirus infection and related mortality in the 85 different regions of the Russian Federation isn't well characterized.

Materials and methods. Population density in the different regions of the Russian Federation is measured as the number of persons per square kilometer of settled areas; ambient temperature is measured as the mean for January and July values; practices for testing for SARS-CoV-2 are characterized via case-fatality rates (the percent of deaths among cases with known outcome (recovered + fatal)) — under more active testing for SARS-CoV-2, greater numbers of mild/moderate cases of infection are detected, resulting in the decline in case-fatality rates, i.e. the intensity of testing is inversely proportional to the case-fatality rate.

Results. The correlation between population density and rates of mortality for COVID-19 per 100,000 persons on November 22, 2020 in the 85 different regions of the Russian Federation is 0.53 (0.36; 0.67); the correlation between case-fatality rates and rates of mortality for COVID-19 per 100,000 persons on Nov. 22, 2020 in the different regions of the Russian Federation is 0.62 (0.47; 0.74). Results of the linear regression suggest a positive association between population density, as well as case-fatality rates and rates of mortality for COVID-19 in the different regions of Russia, and a negative association between ambient temperature and rates of mortality for the novel coronavirus infection.

Conclusions. Lower population density, more active testing for SARS-CoV-2 and higher ambient temperature are associated with lower rates of mortality for COVID-19. In particular, additional measures should be implemented towards testing of different categories of individuals for SARS-CoV-2, including those seeking testing on their own initiative, those seeking medical help with respiratory symptoms, and contacts of confirmed COVID-19 cases.

Keywords: novel coronavirus infection; mortality; population density; case-fatality rate; ambient temperature; testing; regions of the Russian Federation.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

For citation: Goldstein E.M. Factors affecting mortality for the novel coronavirus infection in different regions of the Russian Federation. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(6): 604–607. (In Russ.).
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-6-11>

Received 26 November 2020
Accepted 10 December 2020

Введение

Лабораторная диагностика новой коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 в совокупности с самоизоляцией для инфицированных лиц и отслеживанием/карантином для лиц, контактировавших с инфицированным лицом (контактных лиц), является эффективным способом для уменьшения распространения SARS-CoV-2 и снижения уровня соответствующей смертности¹. Например, в Исландии соответствующая диагностика и карантин/самоизоляция активно практикуются — так, используя серологические данные и данные о лабораторной (полимеразная цепная реакция) диагностике SARS-CoV-2, исследователи оценили, что 56% всех случаев заражения SARS-CoV-2 в Исландии были лабораторно диагностированы [1], что способствовало уменьшению распространения этой инфекции в стране. Ряд исследований указывают на то, что плотность населения положительно связана с распространением SARS-CoV-2 [2–4]. Например, результаты серологического исследования в Испании говорят о том, что уровень заражения SARS-CoV-2 в городах с населением более 100 тыс. человек в среднем составлял 6%, а в разных типах городов и поселений с населением менее 100 тыс. человек —

не более 3,8% [5]. Ряд исследований указывают на то, что SARS-CoV-2 распространяется среди населения медленнее при более высокой температуре воздуха [4, 6, 7]. При этом влияние плотности населения, практики тестирования на SARS-CoV-2 и температуры воздуха на распространение и смертность от COVID-19 в разных субъектах РФ недостаточно изучено.

При более активном тестировании на SARS-CoV-2 лабораторно подтверждается большее количество случаев инфицирования, что способствует предотвращению большего количества новых инфекций путем самоизоляции/карантина для выявленных случаев и контактных лиц, что уменьшает темп распространения инфекции среди населения. Также при более активном тестировании на SARS-CoV-2 выявляется больше случаев заболевания COVID-19 в легкой и средней форме и коэффициент летальности, т.е. процент смертельных случаев среди всех выявленных случаев COVID-19, уменьшается. Хотя активность тестирования непросто напрямую оценить из данных, коэффициент летальности находится в обратной зависимости от активности тестирования в разных субъектах РФ, а коэффициент летальности можно оценить из оперативных данных о SARS-CoV-2.

Цель исследования — оценка связи между плотностью населения, практикой тестирования на SARS-CoV-2, температурой воздуха и смертностью

¹ ВОЗ. Выявление контактных лиц в контексте COVID-19.
URL: <https://www.who.int/publications/i/item/contact-tracing-in-the-context-of-covid-19>

Результаты линейной регрессии зависимости уровня смертности от COVID-19 на 100 тыс. человек на 22.11.2020 г. от плотности населения, коэффициента летальности и температуры воздуха в 85 субъектах РФ

Results of the linear regression with the outcome being the rate of mortality for the novel coronavirus infection per 100,000 on November 22, 2020 in the 85 different regions of the Russian Federation, and the covariates being the population density, case-fatality rate for the novel coronavirus infection and the ambient temperature

Параметр Parameter	Изменение в уровне смертности от COVID-19 на 100 тыс. человек на единицу параметра (коэффициенты) Change in the rates of mortality for the novel coronavirus infection per 100,000 on November 22, 2020 per unit of parameter (coefficients)	<i>p</i>
Плотность населения (на 1 км ² земли населенных пунктов) Population density (per sq. km of settled areas)	0,087 (0,05; 0,12)	<0,000001
Коэффициент летальности, % Case-fatality rate, %	5,861 (3,87; 7,85)	<0,000001
Температура воздуха, °C Ambient temperature, °C	-0,733 (-1,15; -0,32)	0,0008

от COVID-19 в разных субъектах РФ с начала эпидемии до 22.11.2020 г.

Материалы и методы

Мы использовали оперативные данные о количестве выздоровевших среди выявленных случаев COVID-19 и количестве смертей от COVID-19 в разных субъектах РФ на 22.11.2020 г.², а также данные Росстата о численности населения в разных субъектах РФ на 01.01.2020 г.³ в целях оценки уровня смертности от COVID-19 на 100 тыс. человек. Мы также использовали данные Росреестра о землях населенных пунктов в разных субъектах РФ⁴ и данные о средней температуре воздуха по субъекту РФ в январе и июле 2018 г.⁵ (2018 г. — это последний год, для которого результаты анализа данных о температуре в разных субъектах РФ были опубликованы).

Плотность населения в разных субъектах РФ оценивали как количество населения на 1 км² земли населенных пунктов. Коэффициент летальности рассчитывали как процент летальных случаев среди всех выявленных случаев COVID-19 с известным исходом (выздоровевших + умерших) в разных субъектах РФ в период 31.01.2020–22.11.2020. Как отмечалось выше, коэффициент летальности

находится в обратной зависимости от активности тестирования на SARS-CoV-2. Температуру воздуха определяли как среднее между температурами в январе и июле 2018 г. в разных субъектах РФ.

Мы оценили корреляцию между (а) плотностью населения, (б) коэффициентом летальности, (в) температурой воздуха и смертностью от COVID-19 на 100 тыс. человек в 85 субъектах РФ. Для определения зависимости уровня смертности от COVID-19 в совокупности от плотности населения, коэффициента летальности и температуры воздуха в 85 субъектах РФ использовали линейную регрессию.

Результаты

На 22.11.2020 г. в 85 субъектах РФ корреляция между плотностью населения и уровнем смертности от COVID-19 на 100 тыс. человек равна 0,53 (0,36; 0,67), между коэффициентом летальности и уровнем смертности от COVID-19 — 0,62 (0,47; 0,74), между температурой воздуха и уровнем смертности от COVID-19 — -0,10 (-0,31; 0,11).

При увеличении плотности населения на 1 км² на 1 человека уровень смертности от COVID-19 на 100 тыс. человек на 22.11.2020 г. увеличивается на 0,087 (**таблица**). При увеличении коэффициента летальности от COVID-19 на 1% уровень смертности от COVID-19 на 100 тыс. человек на 22.11.2020 г. увеличивается на 5,861. При увеличении температуры воздуха на 1°C уровень смертности от COVID-19 на 100 тыс. человек на 22.11.2020 г. уменьшается на 0,733. Отметим, что в Санкт-Петербурге уровень смертности от COVID-19 на 100 тыс. человек является самым высоким в России, а выявляемость SARS-CoV-2 — одна из самых низких (коэффициент летальности — один из самых высоких в России) [8]. Отметим также, что коэффициент детерминации (R^2) для регрессионной модели равен 0,54, что говорит о влиянии других факторов (помимо 3 факторов, включенных в регрессионную модель) на уровень смертности от COVID-19 в разных

² Стопкоронавирус.РФ. Оперативные данные. 2020.

URL: <https://стопкоронавирус.рф>

³ Федеральная служба государственной статистики (Росстат). Численность постоянного населения на 1 января 2020.

URL: <https://showdata.gks.ru/report/278928/>

⁴ Федеральная служба государственной регистрации, кадастра и картографии (Росреестр). Сведения о наличии и распределении земель в Российской Федерации на 01.01.2020 (в разрезе субъектов Российской Федерации). 2020. URL: <https://rosreestr.gov.ru/site/activity/sostoyanie-zemel-rossii/gosudarstvennyy-natsionalnyy-doklad-o-sostoyanii-i-ispolzovanii-zemel-v-rossiyskoy-federatsii/>

⁵ Федеральная служба государственной статистики (Росстат). Российский статистический ежегодник 2019.

URL: https://rosstat.gov.ru/bgd/regl/b19_13/Main.htm

субъектах РФ. Одним из таких факторов является поведение людей (ношение масок, соблюдение социальной дистанции и т.д.).

Выводы

Осенью и зимой 2020 г. SARS-CoV-2 активно циркулирует в северном полушарии, включая территорию России. При этом влияние различных факторов на распространение и смертность от COVID-19 в разных субъектах РФ недостаточно изучено. Ряд исследований показали, что помимо поведения людей (ношение масок, соблюдение социальной дистанции и т.д.) на распространение SARS-CoV-2 влияют плотность населения, температура воздуха и практика тестирования на SARS-CoV-2.

Мы установили, что более низкая плотность населения, более активное тестирование на SARS-CoV-2 и более высокая температура воздуха способствуют понижению уровня смертности от COVID-19 в разных субъектах РФ. В частности, следует принимать дополнительные меры для повышения уровня тестирования на SARS-CoV-2 среди разных категорий населения, включая лиц, которые хотят тестироваться по собственной инициативе, лиц, обращающихся за медицинской помощью с симптомами ОРВИ, и контактных лиц для подтвержденных случаев COVID-19.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gudbjartsson D.F., Norddahl G.L., Melsted P., Gunnarsdottir K., Holm H., Eythorsson E., et al. Humoral Immune Response to SARS-CoV-2 in Iceland. *N. Engl. J. Med.* 2020; 383(18): 1724–34. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2026116>
2. Bhadra A., Mukherjee A., Sarkar K. Impact of population density on COVID-19 infected and mortality rate in India. *Model. Earth Syst. Environ.* 2020; 1–7. <https://doi.org/10.1007/s40808-020-00984-7>
3. Coskun H., Yildirim N., Gunduz S. The spread of COVID-19 virus through population density and wind in Turkey cities. *Sci. Total Environ.* 2021; 751: 141663. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141663>
4. Rubin D., Huang J., Fisher B.T., Gasparrini A., Tam V., Song L., et al. Association of social distancing, population density, and temperature with the instantaneous reproduction number of SARS-CoV-2 in counties across the United States. *JAMA Netw. Open.* 2020; 3(7): e2016099. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.16099>
5. Pollán M., Pérez-Gómez B., Pastor-Barriuso R., Oteo J., Hernán M.A., Pérez-Olmeda M., et al. Prevalence of SARS-CoV-2

Информация об авторе

Гольдштейн Эдвард Михайлович[✉] — к.ф.-м.н., с.н.с. Гарвардской школы общественного здравоохранения, Бостон, США.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6795-0559>.
E-mail: egoldste@hsph.harvard.edu

in Spain (ENE-COVID): a nationwide, population-based seroepidemiological study. *Lancet.* 2020; 396(10250): 535–44. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31483-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31483-5)

6. Mecenas P., Bastos R.T.D.R.M., Vallinoto A.C.R., Normando D. Effects of temperature and humidity on the spread of COVID-19: A systematic review. *PLoS One.* 2020; 15(9): e0238339. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238339>
7. Carson R.T., Carson S.L., Dye T.K., Mayfield S.A., Moyer D.C., Yu C.A., et al. COVID-19's U.S. temperature response profile. *MedRxiv.* 2020; 2020.11.03.20225581. <https://doi.org/10.1101/2020.11.03.20225581>
8. Гольдштейн Э.М. Выявляемость, коэффициент летальности и уровень смертности от новой коронавирусной инфекции в разных субъектах Российской Федерации во время и до осенней волны эпидемии. *COVID19-PREPRINTS.MICROBE.RU.* Препринт. 2020. <https://doi.org/10.21055/preprints-3111901>

REFERENCES

1. Gudbjartsson D.F., Norddahl G.L., Melsted P., Gunnarsdottir K., Holm H., Eythorsson E., et al. Humoral Immune Response to SARS-CoV-2 in Iceland. *N. Engl. J. Med.* 2020; 383(18): 1724–34. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2026116>
2. Bhadra A., Mukherjee A., Sarkar K. Impact of population density on Covid-19 infected and mortality rate in India. *Model. Earth Syst. Environ.* 2020; 1–7. <https://doi.org/10.1007/s40808-020-00984-7>
3. Coskun H., Yildirim N., Gunduz S. The spread of COVID-19 virus through population density and wind in Turkey cities. *Sci. Total Environ.* 2021; 751: 141663. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141663>
4. Rubin D., Huang J., Fisher B.T., Gasparrini A., Tam V., Song L., et al. Association of social distancing, population density, and temperature with the instantaneous reproduction number of SARS-CoV-2 in counties across the United States. *JAMA Netw. Open.* 2020; 3(7): e2016099. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.16099>
5. Pollán M., Pérez-Gómez B., Pastor-Barriuso R., Oteo J., Hernán M.A., Pérez-Olmeda M., et al. Prevalence of SARS-CoV-2 in Spain (ENE-COVID): a nationwide, population-based seroepidemiological study. *Lancet.* 2020; 396(10250): 535–44. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31483-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31483-5)
6. Mecenas P., Bastos R.T.D.R.M., Vallinoto A.C.R., Normando D. Effects of temperature and humidity on the spread of COVID-19: A systematic review. *PLoS One.* 2020; 15(9): e0238339. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238339>
7. Carson R.T., Carson S.L., Dye T.K., Mayfield S.A., Moyer D.C., Yu C.A., et al. COVID-19's U.S. temperature response profile. *MedRxiv.* 2020; 2020.11.03.20225581. <https://doi.org/10.1101/2020.11.03.20225581>
8. Goldstein E. Detectability of the novel coronavirus (SARS-CoV-2) infection, case-fatality rates and rates of mortality for COVID-19 in different regions of the Russian Federation. *COVID19-PREPRINTS.MICROBE.RU.* Preprint. 2020. <https://doi.org/10.21055/preprints-3111901> (in Russian)

Information about the author

Edward M. Goldstein[✉] — PhD (Physics and Mathematics), senior research scientist, Harvard T.H. Chan School of Public Health, Boston, USA.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6795-0559>.
E-mail: egoldste@hsph.harvard.edu

ХРОНИКА

РЕЗОЛЮЦИЯ

Всероссийской научно-практической интернет-конференции с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность — 2020» (Москва, 6–8 октября 2020 г.)



В соответствии с Планом основных организационных мероприятий Роспотребнадзора на 2020 г. в Москве 6–8 октября 2020 г. состоялась Всероссийская научно-практическая интернет-конференция с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность — 2020». Мероприятие организовано ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора при поддержке Российской академии наук, Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, Национального научного общества инфекционистов.

В конференции приняли участие ведущие мировые ученые, сотрудники различных отраслей сферы здравоохранения. Участниками конференции стали более 6200 специалистов из 85 регионов России и 44 стран ближнего и дальнего зарубежья.

Конференция открылась пленарным заседанием, на котором в докладах ведущих специалистов освещены вопросы о роли молекулярной диагностики в обеспечении биологической безопасности в современном мире. В своем выступлении заместитель руководителя Роспотребнадзора Е.Б. Ежлова подчеркнула, что ситуация с распространением новой коронавирусной инфекции развивается, но, несмотря на рост числа заболевших, Россия занимает 47-е место в мире по уровню заболеваемости COVID-19 на 100 тыс. населения и 105-е место по уровню летальности. Е.Б. Ежлова отметила, что российская эпидемиологическая школа признана лучшей в мире и сейчас есть новый импульс для дальнейшего развития научного потенциала.

По словам директора ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора академика РАН В.Г. Акимкина, в 2019 г. ВОЗ сформулировала десять угроз глобальному здравоохранению, шесть из которых напрямую связаны с инфекционными заболеваниями: глобальная пандемия гриппа, устойчивость к противомикробным препаратам, вирус Эбола и другие микроорганизмы высокой патогенности, отказ от вакцинации, лихорадка Денге, ВИЧ-инфекция. В.Г. Акимкин уверен, что 2020 год уже внес свои коррективы в этот список и в следующем году в него войдет пандемия COVID-19.

По словам советника директора по научной работе ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора академика РАН В.В. Малеева, биологические угрозы последнего десятилетия связаны не только с новыми возбудителями, но и с мутациями хорошо известных «старых» инфекций. В разных точках планеты (в том числе в сопредельных с Россией странах) отмечаются вспышки кори, чумы, сибирской язвы, лихорадки Зика, желтой лихорадки и др. В 2019 г. заявил о себе нетипичный тип менингита, был обнаружен новый штамм ВИЧ. Все это является предпосылками для потенциального завоза инфекций в Российскую Федерацию.

В программу конференции вошли 15 секций с докладами, раскрывающими значение применения молекулярных методов диагностики в эпидемиологических и клинических исследованиях, выступили видные отечественные и зарубежные ученые и специалисты, исследования которых посвящены молекулярным подходам в широком перечне социально значимых направлений медицинских и биологических исследований.

На конференции рассмотрены проблемы биобезопасности и эпидемиологического благополучия населения, а также достижения и перспективы применения молекулярно-биологических технологий в различных областях медицины, освещены вопросы молекулярной диагностики инфекционных болезней вирусной и бактериальной этиологии.

Для эффективного решения актуальных научных и практических задач по совершенствованию оперативного реагирования на инфекционные угрозы, которые несет вирус SARS-CoV-2, в программу конференции был включен день, полностью посвященный новой коронавирусной инфекции. В своем докладе «Эпидемиология COVID-19» директор ЦНИИ Эпидемиологии В.Г. Акимкин отметил, что Россия провела значительную работу по массовому тестированию населения и, по данным на 01.10.2020 г., в нашей стране выполнено уже более 46 млн тестов. Темой секционного заседания «Что мы знаем о COVID-19» стали вопросы, связанные с актуальной информацией о патогенезе, диагностике и профилактике новой коронавирусной инфекции.

На секционном заседании специалисты ведущих учреждений Москвы и Петербурга поделились своим опытом в разработке наборов реагентов для обнаружения РНК SARS-CoV-2, опытом организации массового лабораторного обследования населения при использовании ПЦР-диагностики COVID-19, первыми результатами секвенирования вируса SARS-CoV-2 в России.

В завершение конференции проведен круглый стол профессиональных научных сообществ: Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, Национального научного общества инфекционистов, Федерации лабораторной медицины, на котором выступили академик РАН В.В. Малеев, академик РАН В.Г. Акимкин, профессор М.А. Годков.

Участники конференции констатировали:

Задача обеспечения биобезопасности — ключевая для любой страны. Для ее решения необходимы развитие и совершенствование современных методов молекулярной диагностики и технологий лечения, постоянный мониторинг объектов среды обитания человека, а также активное межведомственное и междисциплинарное взаимодействие для эффективного реагирования на возникновение новых эпидемиологических и биологических угроз.

Изменения климата и связанные с этими процессами биологические и социальные угрозы становятся глобальной проблемой всего человечества, что требует постоянного мониторинга эпидемиологической ситуации в мире и повышения мер противоэпидемической готовности.

Проведение молекулярно-биологических исследований для обнаружения возбудителей инфекционных заболеваний имеет огромное значение для

эпидемиологии. Так, мониторинг распространения коронавирусной инфекции позволил установить время появления возбудителя в популяции — конец ноября 2019 г., а также пути миграции возбудителя и так называемые его точки входа в страну.

Благодаря уникальным возможностям молекулярной биологии и геномных технологий в последние годы начата разработка новых методик, позволяющих создать оригинальные тесты для диагностики и скрининга социально значимых неинфекционных заболеваний, составляющих существенную часть причин смертности населения всех стран.

Одной из наиболее серьезных угроз для человечества в XXI в. является антибиотикорезистентность микроорганизмов и множественная лекарственная устойчивость. Необходимо усилить исследования, направленные на изучение молекулярных механизмов этого процесса. Принципиально новым подходом к лечению ВИЧ-инфекции может стать генная терапия, необходима разработка платформы по производству компонентов системы направленного редактирования генома CRISPR, которые можно использовать как универсальный инструмент для терапии ВИЧ, наследственных и приобретенных заболеваний, среди которых рак, аутоиммунные и орфанные заболевания.

Необходима активная работа по изучению возможностей молекулярной диагностики в профилактике мультифакторных заболеваний.

Несмотря на объединенные усилия всего мирового медицинского и научного сообщества, эпидемиологическая ситуация в мире достаточно напряженная, пандемия COVID-19 продолжается, во всех странах наблюдается стабильный рост заболеваемости.

*Директор ФБУН ЦНИИ эпидемиологии
Роспотребнадзора,
академик РАН В.Г. Акимкин*



РЕЗОЛЮЦИЯ Всероссийской научно-практической интернет-конференции с международным участием «Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы» (Москва, 19–20 октября 2020 г.)

19–20 октября 2020 г. в Москве прошла вторая Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы». Мероприятие проводилось в соответствии с Планом основных организационных мероприятий Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека на 2020 г. и было организовано ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора при поддержке Российской академии наук, Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов и Национального научного общества инфекционистов. В связи с распространением коронавируса конференция проводилась в формате онлайн-трансляции.

В работе конференции приняли участие 2922 человека из 79 регионов Российской Федерации и 14 стран ближнего и дальнего зарубежья, в том числе специалисты Роспотребнадзора, Минздрава России, Минобороны России, Федерального медико-биологического агентства и других ведомств, медицинских организаций (эпидемиологи, иммунологи, педиатры, микробиологи, вирусологи, биологи, медицинские сестры и др.), сотрудники научно-исследовательских институтов различных ведомств, студенты и преподаватели высших учебных заведений, а также представители более 10 отечественных и зарубежных компаний (производители иммунобиологических и других лекарственных препаратов, медицинских изделий и оборудования).

В конференции приняли участие ученые, занимающие лидирующие позиции по проблеме вакцинопрофилактики в мировой науке, из 6 стран европейского региона, а также Бразилии.

Программным вектором конференции стала утвержденная 18 сентября 2020 г. распоряжением Правительства Российской Федерации № 2390 «Стратегия развития иммунопрофилактики инфекционных болезней до 2035 года», направленная на гарантированное обеспечение доступности для всех граждан страны качественной иммунизации современными и эффективными вакцинами. Красной нитью в выступлениях докладчиков прослеживалась необходимость участия и многопрофильного

взаимодействия в деле реализации «Стратегии...» федеральных, региональных, отраслевых, государственных и корпоративных структур, национальных научных сообществ.

Конференция была открыта заместителем руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Е.Б. Ежловой, которая подчеркнула в своем докладе, что на сегодняшний день вакцинопрофилактика остается основным и самым надежным способом борьбы с инфекционными заболеваниями. В мире разработано более 100 различных вакцинных препаратов, которыми контролируются около 46 заболеваний.

Говоря об актуальных вопросах эпидемиологического надзора в современных условиях, Е.Б. Ежлова отдельно остановилась на ситуации с новой коронавирусной инфекцией, которую ВОЗ расценила как пандемию. Несмотря на рост ежедневного числа регистрируемых случаев, в настоящее время Россия занимает 47-е место по уровню заболеваемости на 100 тыс. населения и 105-е место по уровню летальности.

Большой научный и практический интерес вызвали представленные в ходе пленарного заседания доклады известных отечественных ученых: академик РАН В.Г. Акимкина, Н.И. Брико, Л.С. Намазовой-Барановой, Ю.В. Лобзина, В.В. Зверева, а также члена-корреспондента РАН О.А. Свитич и генерального директора ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора Р.А. Максютова.

В течение двух дней конференции в ходе 2 пленарных и 17 секционных заседаний было представлено 88 докладов, посвященных ключевым проблемам иммунопрофилактики: выполнению глобальных программ ликвидации инфекционных болезней, стратегии «Иммунизация на протяжении всей жизни», перспективам развития Национального календаря прививок, обеспечению безопасности и эффективности иммунизации, реализации стратегии ВОЗ в национальных программах иммунизации, региональным календарям профилактических прививок как модели развития национального календаря, персонализации вакцинопрофилактики.

В докладах участников продемонстрирован огромный вклад иммунизации в достижение глобальных целей общественного здравоохранения, а также национальных целей проекта «Здравоохранение», в частности снижения смертности населения, в том числе младенческой смертности, и увеличения продолжительности жизни.

В программе конференции почти треть докладов были посвящены вопросам совершенствования Национального календаря профилактических прививок (НКПП) в направлении как расширения списка инфекционных болезней, в отношении которых проводится вакцинопрофилактика, так и расширения контингентов, подлежащих профилактическим прививкам.

Наибольшее внимание участников закономерно привлекла тематика, связанная с перспективой и потенциалом вакцинопрофилактики в борьбе с пандемией COVID-19.

В ряде сообщений было отмечено, что, несмотря на уже достигнутый прогресс, цели по ликвидации и элиминации болезней, таких как корь и вакциноассоциированный полиомиелит, не достигнуты из-за неполного охвата плановой вакцинацией коревой и инактивированной полиомиелитной вакциной на уровне каждого муниципального образования. Не все дети имеют возможность доступа к новым и усовершенствованным вакцинам на бесплатной основе.

Участники конференции развернули активную дискуссию по вопросам противодействия антивакцинальной пропаганде, составления индивидуальных календарей прививок.

В завершение работы конференции проведен круглый стол профессиональных научных сообществ: Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов и Национального научного общества инфекционистов.

Участники Конференции решили:

Считать приоритетной задачей реализацию «Стратегии развития иммунопрофилактики инфекционных болезней до 2035 года» в следующих направлениях:

- оптимизация НКПП и календаря профилактических прививок по эпидемическим показателям с включением максимально полного перечня инфекций, которые могут быть предотвращены с помощью вакцин, в том числе внедрение новых вакцин против ряда инфекционных болезней, являющихся в современных условиях причиной летальных исходов, таких как ротавирусная, папилломавирусная инфекция и ветряная оспа;

- совершенствование вакцинопрофилактики таких бактериальных инфекций, как пневмококковая, менингококковая, Нib-инфекция и коклюш, в

целях не только снижения заболеваемости и смертности от этих инфекций детского и взрослого населения, но и профилактики формирования антибиотикорезистентности; обеспечение возможности вакцинации против Нib-инфекции для всех детей, а не только групп риска; внедрение в НКПП ревакцинирующих прививок против коклюша детям старших возрастных групп, а также взрослым групп риска с целью профилактики передачи возбудителя коклюша от них детям первого года жизни;

- совершенствование системы государственного контроля (надзора) и нормативно-правового регулирования в сфере иммунопрофилактики на основе данных доказательной медицины, проведение на постоянной основе мониторинга социально-экономической значимости вакциноуправляемых инфекций как критерия эффективности вакцинопрофилактики для своевременного принятия управленческих решений по коррекции тактики иммунизации;

- стимулирование научных разработок, в том числе для использования при создании отечественных вакцин данных об актуальной антигенной структуре возбудителей, циркулирующих на территории страны; для разработки современных технологий эпидемиологического надзора за вакциноуправляемыми инфекциями и вакцинопрофилактикой, в том числе молекулярно-генетических методов, ГИС-технологий, исследований популяционного иммунитета, а также математического моделирования эпидемического процесса; изучения факторов, способствующих и препятствующих использованию медицинских услуг по вакцинации, разработке и реализации адресных стратегий, направленных на стимулирование спроса на иммунизацию;

- развитие российских производственных предприятий по выпуску иммунобиологических препаратов, организации в Российской Федерации производства полного цикла поливалентных пневмококковой и менингококковой конъюгированных вакцин, ротавирусной и папилломавирусной вакцин, вакцины против вируса *Varicella zoster*, комбинированных пяти- и шестикомпонентных вакцин с бесклеточным коклюшным, Нib-компонентом и инактивированной вакциной против полиомиелита, а также квадριвалентной вакцины против гриппа;

- совершенствование технологий обеспечения безопасности иммунопрофилактики, в том числе модернизация оборудования для хранения и транспортирования иммунобиологических лекарственных препаратов в условиях «холодовой цепи», включая средства контроля температуры; внедрение передовых технологий обеспечения безопасности инъекций;

- организация системного мониторинга за побочными проявлениями, внедрение методических

рекомендаций по мониторингу побочных проявлений после иммунизации, разработанных на основе руководства ВОЗ и утвержденных в 2019 г.;

- распределение адекватных кадровых и финансовых ресурсов для достижения целей, обеспечения качества и эффективности выполнения «Стратегии развития иммунопрофилактики инфекционных болезней до 2035 года».

Участники конференции также подчеркнули необходимость и важность внедрения и применения передовых практик вакцинопрофилактики, в том числе:

- применения комбинированных вакцин в целях повышения охвата вакцинацией детей первых лет жизни, приверженности родителей иммунопрофилактике благодаря снижению инъекционной на-

грузки на ребенка за одно посещение прививочного кабинета и оптимизации графика вакцинации, обеспечивающего проведение прививок ротавирусной и пневмококковой конъюгированной вакциной;

- разработки и внедрения федеральных клинических рекомендаций по специфической профилактике отдельных инфекционных болезней, включая принципы «догоняющей» и сочетанной иммунизации, а также формирования индивидуального графика вакцинации;

- создания в рамках информатизации здравоохранения электронной базы данных о вакцинации, заболеваемости вакциноуправляемыми инфекциями и побочных проявлениях после иммунизации, внедрения электронного прививочного сертификата.

*Директор ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
академик РАН В.Г. Акимкин*



РЕЗОЛЮЦИЯ 8-го Конгресса с международным участием «Контроль и профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП-2020)» (Москва, 25–27 ноября 2020 г.)

25–27 ноября 2020 г. в соответствии с Приказом руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека № 372 от 03.07.2020 г. состоялся интернет-конгресс с международным участием «Контроль и профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП-2020)».

В работе Конгресса приняли участие более 4000 человек из 78 регионов Российской Федерации — специалисты Роспотребнадзора, Минздрава России, Росздравнадзора, Министерства обороны Российской Федерации, других ведомств и медицинских организаций (эпидемиологи, микробиологи, клинические фармакологи, дезинфектологи, хирурги, реаниматологи, педиатры, медицинские сестры и др.), сотрудники научно-исследовательских институтов различных ведомств, студенты и преподаватели высших учебных заведений, члены профессиональных научных сообществ — Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, Национального научного общества инфекционистов, Федерации лабораторной медицины, а также представители отечественных и зарубежных компаний — производителей дезинфицирующих средств, медицинских изделий и оборудования. В Конгрессе приняли участие девять ведущих мировых научных лидеров из Японии и трех стран Европы. Слушателями Конгресса также стали специалисты из Австрии, Азербайджана, Армении, Беларуси, Германии, Донецкой Народной Республики, Казахстана, Канады, Киргизии, Молдовы, Турции, Узбекистана, Украины, Японии.

После вступительных слов академика-секретаря медицинского отделения Российской академии наук, академика РАН В.И. Стародубова и руководителя секции профилактической медицины отделения медицинских наук РАН, академика РАН В.А. Тутельяна работа Конгресса началась докладом директора ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (ФБУН ЦНИИЭ), академика РАН В.Г. Акимкина, в котором были отражены вехи научного развития проблемы ИСМП в России и мире, подчеркнута ведущая роль ФБУН ЦНИИЭ.

Особый интерес вызвали доклады известных отечественных ученых: Н.И. Брико, И.А. Дятлова,

В.В. Покровского, Р.С. Козлова, а также ведущих зарубежных исследователей: профессоров Д. Питте (Швейцария), О. Ассадиана (Австрия), А. Крамера (Германия), М. Хирошиге (Япония).

В рамках Конгресса проведены пленарное и 18 секционных заседаний, школы эпидемиолога и молодого ученого, совместное заседание научных обществ, на которых обсуждались актуальные аспекты проблемы профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в том числе государственный санитарно-эпидемиологический надзор за ИСМП, уроки пандемии COVID-19 в России и Европе, состояние проблемы лекарственной устойчивости патогенов в современный период, обеспечение защиты медицинского персонала от гемоконтактных инфекций, ход реализации Стратегии предупреждения антимикробной резистентности в Российской Федерации и пилотного проекта «Обеспечение эпидемиологической безопасности медицинской помощи», а также вопросы обеспечения эпидемиологической безопасности медицинских технологий.

Ключевой темой Конгресса являлась проблема эпидемиологической безопасности лечебно-диагностического процесса для пациентов и медицинского персонала в условиях пандемии COVID-19 как основной составляющей системы профилактики ИСМП и важнейшего показателя качества оказания медицинской помощи. Выступавшими подчеркнута важность правильной организации работы медицинских учреждений, включая диагностические лаборатории, детально обсуждены актуальные вопросы эпидемиологической диагностики и профилактики COVID-19, эпидемиологической безопасности медицинского персонала в зонах повышенного риска.

Отдельные заседания были посвящены вопросам дезинфекции поверхностей, воздуха в помещениях, дезинфекции систем вентиляции, обеззараживания изделий медицинского назначения и рук медицинских работников, проблемам выбора средств, технологий их применения. Значительное внимание было уделено мировому опыту организации стерилизационных мероприятий, принципам и критериям выбора средств, оборудования и вспомогательных материалов для предстерилизационной очистки и стерилизации изделий медицинского назначения.

Всего заслушано 118 докладов. Участники Конгресса отметили высокий профессиональный уровень сообщений и глубокий интерес участников к различным направлениям профилактики ИСМП. В рамках заседаний секций участниками была развернута активная творческая дискуссия по рассматриваемым научным и практическим вопросам.

Участники Конгресса решили:

1. Считать приоритетной задачей реализацию пилотного проекта «Совершенствование мер борьбы и профилактики ИСМП», активизацию усилий органов исполнительной власти в сфере охраны здоровья населения на местах и руководителей медицинских организаций по достижению целевых показателей проекта.

2. Признать необходимость актуализации существующей системы эпидемиологического надзора за ИСМП с целью повышения эффективности управления эпидемическим процессом этих инфекций с использованием риск-ориентированных технологий, научно-методических и организационных основ эпидемиологической диагностики в условиях модернизации системы здравоохранения страны.

3. Считать недостаточной работу специалистов органов исполнительной власти субъектов Российской Федерации в сфере охраны здоровья населения и территориальных органов Роспотребнадзора по организации межведомственного взаимодействия в целях реализации ключевых направлений эпидемиологического надзора и профилактики ИСМП.

4. Признать необходимость актуализации Национальной концепции профилактики ИСМП на основе современных научных знаний, совершенствования и гармонизации с международными требованиями нормативно-правового и методического обеспечения системы эпидемиологического надзора за ИСМП, ключевых компонентов по обеспечению эпидемиологической безопасности медицинской помощи в медицинских организациях, в том числе при возникновении чрезвычайных ситуаций.

5. Развивать подходы по совершенствованию лабораторной диагностики и проведению микробиологического мониторинга — важнейшего компонента системы эпидемиологического надзора за ИСМП. Для решения практических задач эпидемиологического надзора за ИСМП активнее внедрять молекулярно-генетический мониторинг возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, с целью оценки, прогнозирования эпидемической ситуации и обоснования своевременного вмешательства в ход эпидемического процесса.

6. Признать необходимым расширение стратегий научных и инновационных исследований в области профилактики ИСМП. Инициировать научные исследования в области совершенствования методов обеспечения биологической безопасности при оказании медицинской помощи в учреждениях

здравоохранения, профилактики риска инфицирования вирусом SARS-CoV-2 медицинского персонала. Оценить эффективность мероприятий по перспективным инновациям в профилактике ИСМП и, в случае необходимости, обеспечить их внедрение на основе имеющихся данных.

7. Продолжить мероприятия по оценке мониторинга антибиотикорезистентности микроорганизмов-возбудителей ИСМП к применяемым антибиотикам, устойчивости их к дезинфицирующим средствам, по разработке на основе полученных данных новых альтернативных технологий и внедрению эффективных практических мер.

8. Считать целесообразным развитие и внедрение динамической геоинформационной системы сбора, хранения, обработки, анализа и графической визуализации данных мониторинга заболеваемости ИСМП в Российской Федерации.

9. Отметить ведущую роль неспецифической профилактики ИСМП в ряду мер, направленных на предупреждение данной группы инфекций. Продолжать совершенствование и внедрение в практику медицинских организаций современных эффективных, безопасных, в том числе биологических, методов и технологий дезинфекции и стерилизации.

10. Отметить важность образовательной деятельности в области эпидемиологии и профилактики ИСМП, соблюдения требований биологической безопасности при оказании медицинской помощи в условиях распространения COVID-19, предупреждения формирования и распространения устойчивости микроорганизмов к противомикробным препаратам для всех категорий медицинских работников; продолжить практику проведения интерактивных семинаров и дистанционного обучения.

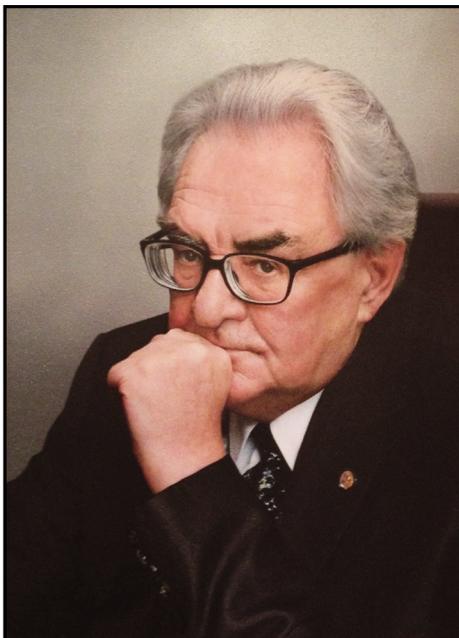
11. Считать необходимым повышение уровня приверженности медицинских работников вакцинопрофилактике, обеспечение должного уровня охвата всех категорий персонала медицинских организаций профилактической иммунизацией в рамках Национального календаря профилактических прививок и календаря прививок по эпидемическим показаниям. Для повышения информированности медицинских работников по вопросам иммунопрофилактики рассмотреть возможность включения стандартов иммунизации в федеральные образовательные и профессиональные стандарты врачей всех специальностей.

12. Отметить необходимость повышения роли общественных медицинских организаций в разработке критериев подготовки и повышения квалификации медицинских работников по вопросам профилактики ИСМП, расширения и активизации международного сотрудничества для совместных научных исследований по приоритетным направлениям ИСМП.

*Директор ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
академик РАН В.Г. Акимкин*

НЕКРОЛОГ

Памяти Валентина Ивановича Покровского



29 октября 2020 г. ушел из жизни великий ученый, академик Валентин Иванович Покровский.

Валентин Иванович Покровский — академик РАН и РАО, крупный клиницист-инфекционист и эпидемиолог, ученый с мировым именем, скончался на девяносто втором году жизни после продолжительной болезни.

Валентин Иванович возглавлял Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии на протяжении 47 лет, именно под его руководством Институт обрел современный облик и государственный статус, став ведущим российским научным учреждением в области диагностики и эпидемиологического надзора.

Отличительной чертой научной деятельности Валентина Ивановича Покровского была уникальная способность предвидеть запросы практического здравоохранения, эффективно и быстро внедрять в практику новейшие методы диагностики, лечения и профилактики инфекционных болезней на основе фундаментальных и теоретических разработок в области инфекционной патологии и эпидемиологии. Им изучены механизмы развития и созданы передовые методы клинико-лабораторной диагностики и терапии таких опасных и социально значимых инфекционных заболеваний, как менингококковая инфекция, холера, брюшной тиф, чума, ВИЧ-инфек-

ция и многие другие. Эти работы позволили спасти тысячи человеческих жизней и предотвратить распространение эпидемических вспышек как в России, так и за её пределами. Они приобрели хрестоматийный характер, их значимость и актуальность не утрачены и в наши дни.

Валентин Иванович принимал непосредственное участие в ликвидации многих эпидемических вспышек в России и за её пределами. Он стал инициатором и главным разработчиком нового патогенетического направления в лечении холеры и других кишечных инфекций. Благодаря его работе последствия мировой эпидемии холеры в 1960-х годах оказались для нашей страны минимальными. Огромный вклад В.И. Покровский внес в изучение и разработку методов диагностики и лечения неизвестных или ранее не выявлявшихся в нашей стране болезней: микоплазмоза, ротавирусной инфекции, легионеллеза, пневмоцистоза. Он одним из первых оценил опасность распространения ВИЧ-инфекции и сосредоточил усилия на изучении фундаментальных и прикладных аспектов проблемы. Это позволило разработать и внедрить в практику здравоохранения России научно обоснованную систему профилактики и диагностики ВИЧ-инфекции.

В последние годы Валентин Иванович уделял особое внимание теоретическим основам эпидемиологии. Им разработана социально-экологическая

концепция, на базе которой усовершенствованы методы эпидемиологического надзора, профилактики и борьбы с инфекционными болезнями, успешно реализующиеся в рамках национальных проектов и федеральных целевых программ.

Валентин Иванович Покровский — создатель крупной отечественной школы ученых-инфекционистов. Под его руководством подготовлено около 70 докторских и 140 кандидатских диссертаций, опубликовано более 600 научных работ, в том числе 18 монографий. Ученики В.И. Покровского возглавляют крупные научные центры и кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии в России и странах СНГ.

Валентин Иванович был крупнейшим организатором медицинской науки государственного масштаба. На протяжении 19 лет, с 1987 года, он возглавлял Академию медицинских наук СССР, а затем Российскую академию медицинских наук. Под его руководством был разработан ряд научных программ, реорганизована структура РАМН, созданы новые региональные центры РАМН в районах Крайнего Севера, Сибири, в южных районах стра-

ны. В течение 20 лет он был главным инфекционистом Минздрава СССР.

Валентин Иванович Покровский являлся экспертом Всемирной организации здравоохранения, членом Правления Международной ассоциации инфекционистов России, председателем Всесоюзного научно-практического общества микробиологов, эпидемиологов и иммунологов, председателем Научного общества инфекционистов.

Заслуги Валентина Ивановича неоднократно были отмечены государственными наградами: орденом Трудового Красного Знамени, орденом Ленина, орденом «За заслуги перед Отечеством» III степени, медалью «В память 850-летия Москвы», орденом «За заслуги перед Отечеством» II степени, Государственной премией, премией Правительства Российской Федерации, благодарностью Президента Российской Федерации.

Мы скорбим об утрате прекрасного человека, гениального ученого, великого учителя, выражаем искренние соболезнования семье и близким Валентина Ивановича, его друзьям и коллегам.

СВЕТЛАЯ ПАМЯТЬ

Указатель статей, опубликованных в журнале в 2020 году

Оригинальные исследования

- Алимов А.В., Смирнова С.С., Леленкова Е.В., Маркарян А.Ю., Вялых И.В., Веревищников В.К., Комиссаров А.Б., Соминина А.А. Роль вирусов гриппа в развитии тяжелых форм острых респираторных инфекций у пациентов, госпитализированных в стационары г. Екатеринбурга в эпидемический сезон 2017–2018 гг. **2, 140**
- Андрюков Б.Г., Сомова Л.М., Ляпун И.Н., Былина М.П., Матосова Е.В. Особенности изменений спектров жирных кислот бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в процессе формирования устойчивых (дормантных) клеточных форм **5, 401**
- Арзуманян В.Г., Иксанова А.М., Артемьева Т.А., Бутовченко Л.М. Влияние иммунизации кроликов дрожжевыми антигенами на активность фракции сывороточных антимикробных пептидов **1, 19**
- Асатрян М.Н., Герасимук Э.Р., Логунов Д.Ю., Семенов Т.А., Гинцбург А.Л. Прогнозирование динамики заболеваемости COVID-19 и планирование мероприятий по вакцинопрофилактике населения Москвы на основе математического моделирования **4, 289***
- Асратян А.А., Семенов Т.А., Кальнин И.Б., Орлова О.А., Соловьев Д.В., Русакова Е.В., Казарян С.М., Кузин С.Н. Современные эпидемиологические особенности вирусных гепатитов В и С, туберкулеза и ВИЧ-инфекции в психиатрических стационарах **1, 32**
- Ахапкина И.Г., Глушакова А.М., Родионова Е.Н., Качалкин А.В. Колонизационная активность клинических изолятов дрожжевых грибов рода *Candida* и их антибиотикочувствительность **5, 418**
- Бисенбай А.О., Жигайлов А.В., Перфильева Ю.В., Найзабаева Д.А., Неупокоева А.С., Бердыгулова Ж.А., Остапчук Е.О., Мальцева Э.Р., Куатбекова С.А., Низкородова А.С., Дмитровский А.М., Скиба Ю.А., Мамадалиев С.М. Эпидемиология и молекулярно-генетическая характеристика возбудителей Лайм-боррелиоза, циркулирующих в популяции клещей на территории Алматинской области Республики Казахстан **6, 535**
- Бутакова Л.В., Сапега Е.Ю., Троценко О.Е. Молекулярно-эпидемиологические особенности циркуляции энтеровируса Коксаки А10 в Дальневосточном федеральном округе **4, 324**
- Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Олейников И.П., Писанов Р.В. Выявление штаммов *Vibrio cholerae* «гаитянской» группы с помощью полимеразной цепной реакции на основе INDEL-типирования **3, 265**
- Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Водопьянов С.О., Олейников И.П. Совершенствование методики SNP-типирования штаммов *Vibrio cholerae* на основе анализа первичных данных полногеномного секвенирования **6, 587**
- Водяницкая С.Ю., Сергиенко О.В., Иванова Н.Г., Балахнова В.В., Архангельская И.В., Ренгач М.В., Непомнящая Н.Б., Воловикова С.В. О результатах мониторинговых исследований балластных вод и данных идентификации штаммов вибрионов, выделенных в ходе исследований судов в российских морских портах в 2018 году **1, 55**
- Воронина О.Л., Тартаковский И.С., Юцук Н.Д., Рыжова Н.Н., Аксёнова Е.И., Кунда М.С., Кутузова А.В., Мелкумян А.Р., Карпова Т.И., Груздева О.А., Климова Е.А., Кареткина Г.Н., Чемерис О.Ю., Тарасова Т.А., Дронина Ю.Е., Орлова О.Е., Бурмистрова Е.Н., Цибин А.Н. Анализ спорадических случаев инвазивного листериоза в мегаполисе **6, 546***
- Годвалов А.П., Карпунина Т.И. Состав микробиоты репродуктивного тракта женщин при бесплодии **1, 26**
- Демидова Н.А., Климова Р.Р., Куц А.А., Леснова Е.И., Масалова О.В., Дорофеева А.Д., Никонова А.А., Федорова Н.Е., Зверев В.В. Получение и характеристика моноклональных антител к G-белку респираторно-синцитиального вируса **1, 7**
- Зайцев Е.М., Бажанова И.Г., Брицина М.В., Мерцалова Н.У., Озерецковская М.Н. Бесклеточная коклюшная вакцина из антигенов свежeweыделенного штамма *V. pertussis* серовара 1.2.3 **2, 134**
- Зайцев Е.М., Брицина М.В., Озерецковская М.Н., Мерцалова Н.У., Бажанова И.Г. Чувствительность биопленок *Bordetella pertussis* к поливалентной коклюшной сыворотке **5, 413**
- Зайцев Е.М., Брицина М.В., Озерецковская М.Н., Мерцалова Н.У., Бажанова И.Г. Чувствительность биопленок вакцинных и свежeweыделенных штаммов *Bordetella pertussis* к антибиотикам **6, 529**

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

- Захарова Ю.В., Сухих А.С., Леванова Л.А., Плотникова Е.Ю. Изучение *in vitro* влияния ДНК пробиотического штамма *Bifidobacterium bifidum* на количественный уровень и колонизационные свойства кишечных микросимбионтов **5, 424**
- Игнатъев Г.М., Каа К.В., Оксанич А.С., Антонова Л.П., Самарцева Т.Г., Мефед К.М., Яковлева Д.А., Жиренкина Е.А. Индикация и идентификация вирусов денге и Чикунгунья в комарах рода *Aedes spp.*, отловленных в Центральной Америке **3, 227***
- Колесин И.Д., Житкова Е.М. Модель профилактической эффективности противогриппозной вакцины с поправкой на гипотезу антигенного роста **1, 15**
- Котенева Е.А., Цыганкова О.И., Калинин А.В., Родионов И.С., Абрамович А.В., Щербакова В.Ю. Особенности получения белкового комплекса вегетативных культур *Bacillus anthracis* для протеомного картирования штаммов **4, 331**
- Лаврентьева И.Н., Хамитова И.В., Samara J., Антипова А.Ю., Бичурина М.А., Magassouba N.F., Никишов О.Н., Кузин А.А., Семенов А.В. Состояние гуморального иммунитета к парвовирусу В19 у населения отдельных географических регионов **3, 233***
- Ленева И.А., Фалынскова И.Н., Карташова Н.П., Глубокова Е.А., Поддубиков А.А., Свитич О.А. Изучение роли иммунитета к нейраминидазе вируса гриппа в защите от вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной *S. aureus* после гриппозной инфекции у мышей **6, 564**
- Медкова А.Ю., Синяшина Л.Н., Амичба А.А., Семин Е.Г., Шевцова З.В., Матуа А.З., Джидарян А.А., Кубрава Д.Т., Конджария И.Г., Баркая В.С., Миквабия З.Я., Каратаев Г.И. Доклинические исследования безопасности, иммуногенности и защитной активности аттенуированных бактерий *Bordetella pertussis* на экспериментальной модели *Macaca mulatta* **4, 312***
- Мескина Е.Р. Предварительный клинико-эпидемиологический анализ первых 1000 случаев COVID-19 у детей в Московской области **3, 202***
- Миронов К.О., Корчагин В.И., Михайлова Ю.В., Янушевич Ю.Г., Шеленков А.А., Чагарян А.Н., Иванчик Н.В., Козлов Р.С., Акимкин В.Г. Характеристика штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от больных инвазивными пневмококковыми инфекциями, с использованием высокопроизводительного секвенирования **2, 113***
- Нагиева Ф.Г., Баркова Е.П., Строева А.Д., Сидоров А.В., Лотте В.Д., Зверев В.В. Характеристика связывания вакцинных штаммов вируса *Varicella zoster* с препаратами мембранных рецепторов мозга мышей **2, 125***
- Нагиева Ф.Г., Баркова Е.П., Строева А.Д., Сидоров А.В., Зверев В.В. Характеристика маркеров холодовой адаптации кандидатных вакцинных штаммов для живых аттенуированных вакцин против ветряной оспы и опоясывающего герпеса **4, 303***
- Ногойбаева К.А., Тобокалова С.Т. Этиологическая и эпидемиологическая характеристика летальности от острого вирусного гепатита в Кыргызстане в 2009–2018 гг. **1, 40**
- Плеханов Н.А., Заднова С.П., Крицкий А.А., Полунина Т.А., Котова Н.В., Баданин Д.В., Смирнова Н.И. Протеомный анализ типичных и генетически измененных штаммов *Vibrio cholerae* O1 серогруппы биовара El Tor **6, 578**
- Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Пяташина М.А., Сизова Е.П., Юзлибаева Л.Р., Лялина Л.В., Смирнов В.С., Бадамынина Г.Г., Гончарова А.В., Арбузова Т.В., Ломоносова В.И., Толоян А.А. Характеристика серопревалентности к SARS-CoV-2 среди населения Республики Татарстан на фоне COVID-19 **6, 518***
- Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Степанова Т.Ф., Шарухо Г.В., Летюшев А.Н., Фольмер А.Я., Шепоткова А.А., Лялина Л.В., Смирнов В.С., Степанова К.Б., Панина Ц.А., Сидоренко О.Н., Иванова Н.А., Смирнова С.С., Мальченко И.Н., Охотникова Е.В., Стахова Е.Г., Толоян А.А. Распределение серопревалентности к SARS-CoV-2 среди жителей Тюменской области в эпидемическом периоде COVID-19 **5, 393***
- Селянская Н.А., Березняк Е.А., Тришина А.В., Симонова И.Р., Егизарян Л.А., Водопьянов А.С. Пространственная визуализация данных по антибиотикорезистентности штаммов холерных вибрионов, изолированных на территории России **1, 47**
- Селянская Н.А., Водопьянов С.О., Рыкова В.А., Соколова Е.П. Трансмиссивная антибиотикоустойчивость, обусловленная SXT-элементом, у холерных вибрионов, выделенных на территории России **3, 258**
- Сперанская А.С., Каптелова В.В., Самойлов А.Е., Бухарина А.Ю., Шипулина О.Ю., Корнеев Е.В., Акимкин В.Г. Генетическая вариабельность SARS-CoV-2 в биологических образцах от пациентов г. Москвы **6, 511***
- Строкова О.А., Кремлёва Е.А., Константинова О.Д., Сгибнев А.В. Регуляция микроэкологического состояния нижних отделов женского репродуктивного тракта витаминами **3, 251**

Устюжанин А.В., Чистякова Г.Н., Ремизова И.И. Филогенетический анализ родства штаммов *Klebsiella pneumoniae* по генам *ige* и *fit* **6, 556**

Филатов Ф.П., Шаргунов А.В. Тетрануклеотидный профиль герпесвирусы ДНК **3, 216***

Христова Д., Кандова Я., Николов Г., Петрунов Б. Сенсбилизация к аллергенам плесневых грибов у пациентов с респираторной аллергией. Оптимизация диагностического процесса **2, 119***

Шмыленко В.А., Бондаренко А.П., Троценко О.Е., Туркутюков В.Б., Базыкина Е.А. Характеристика назофарингеального носительства бактериальных патогенов у детей и взрослых с рецидивирующими респираторными заболеваниями в Хабаровске (2015–2018 гг.) **3, 242**

Обзоры

Андрюков Б.Г., Ляпун И.Н. Молекулярные механизмы персистенции бактерий **3, 271**

Андрюков Б.Г., Ляпун И.Н., Матосова Е.В. Значение мембранных фосфолипидов в реализации защитных стратегий бактерий **6, 594**

Бухарин О.В., Перунова Н.Б. Роль микробиоты в регуляции гомеостаза организма человека при инфекции **5, 458***

Долгушин И.И., Мезенцева Е.А. Нейтрофильные внеклеточные ловушки в борьбе с биопленкообразующими микроорганизмами: охотники или добыча? **5, 468***

Зайцев А.Е., Курбатова Е.А., Егорова Н.Б., Сухова Е.В., Нифантьев Н.Э. Иммунологические и эпидемиологические аспекты иммуногенности капсульного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 3 в составе пневмококковых вакцин **1, 72**

Левченко Д.А., Архангельская И.В., Кругликов В.Д., Подойницына О.А. Атипичность штаммов *Vibrio cholerae* O1 по признаку агглютинабельности **5, 482**

Леонова Г.Н. Клещевой энцефалит в Дальневосточном очаговом регионе евразийского континента **2, 150**

Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М., Титова С.В. Экологические особенности персистенции холерных вибрионов: ретроспективный анализ и современное состояние проблемы **2, 165**

Михайлова Н.А., Воеводин Д.А., Лазарев С.А. Современные представления о про-/эукариотических взаимодействиях организма человека — основа создания нового поколения пробиотических препаратов **4, 346***

Нагорных А.М., Тюменцев А.И., Тюменцева М.А., Акимкин В.Г. SARS, снова SARS и MERS. Обзор животных моделей респираторных синдромов человека, вызываемых коронавирусами инфекциями **5, 431***

Ноздрачева А.В., Семенов Т.А. Состояние популяционного иммунитета к кори в России: систематический обзор и метаанализ эпидемиологических исследований **5, 445**

Пименова Е.В., Храпова Н.П., Замарина Т.В. Модели *in vitro* для изучения вируса Зика **2, 159**

Писанов Р.В., Шипко Е.С., Дуванова О.В., Симакова Д.И. Идентификация микроорганизмов с применением газовой хромато-масс-спектрометрии **4, 356**

Сомова Л.М., Андрюков Б.Г., Ляпун И.Н. Гетероморфизм клеточной персистенции возбудителей сапронозов в различных условиях среды обитания **1, 62**

Шатунова П.О., Быков А.С., Свитич О.А., Зверев В.В. Ангиотензинпревращающий фермент 2. Подходы к патогенетической терапии COVID-19 **4, 339***

Шлепотина Н.М., Пешикова М.В., Колесников О.Л., Шишкова Ю.С. Современные представления о механизмах взаимодействия биопленки и факторов клеточного иммунитета **1, 83**

Краткие сообщения

Акимкин В.Г., Кузин С.Н., Шипулина О.Ю., Яцышина С.Б., Тиванова Е.В., Каленская А.В., Соловьева И.В., Вершинина М.А., Квасова О.А., Плоскирева А.А., Мамошина М.В., Елькина М.А., Андреева Е.Е., Иваненко А.В., Микаилова О.М. Эпидемиологическое значение определения РНК SARS-CoV-2 среди различных групп населения Москвы и Московской области в период эпидемии COVID-19 **3, 197***

Гольдштейн Э.М. Факторы, влияющие на смертность от новой коронавирусной инфекции в разных субъектах Российской Федерации **6, 604**

Наука и практика

Игнатъев Г.М., Отрашевская Е.В., Суханова Л.Л., Сидоренко Е.С., Нетесова Н.А. Молекулярно-генетическое исследование штамма Ленинград-16, используемого для производства вакцины кори **2, 182**

Кукаркина В.А., Голубкова А.А., Подымова А.С. Современные практики иммунизации детей, экспонированных ВИЧ и ВИЧ-инфицированных **4, 375**

Ломоносова А.В. Причины и последствия несвоевременной вакцинации против коклюшной инфекции в Российской Федерации **5, 492**

Фельдблюм И.В., Субботина К.А., Рычкова О.А., Миронов А.Н., Волкова Д.А., Метов А.О., Сакаева И.В., Купина Н.В., Карбышев М.С., Миронов Н.А., Кондратьева Я.Ю. Реактогенность, безопасность и иммунологическая эффективность вакцины для профилактики ротавирусной инфекции пентавалентной живой при иммунизации детей (результаты многоцентрового клинического исследования) **4, 363***

Дискуссии

Михеева М.А., Михеева И.В. Динамика рейтинга экономического ущерба от инфекционных болезней как критерий эффективности эпидемиологического контроля **2, 174***

История науки

Белов А.Б., Панин А.Л. Теория сапронозных инфекций: история развития и пути совершенствования в системе медико-биологических наук **1, 91**

Морозова О.М., Трошина Т.И., Морозова Е.Н., Морозов А.Н. Пандемия испанки 1918 года в России. Вопросы сто лет спустя **6, 592**

Хроника

Акимкин В.Г. Резолюция Конгресса с международным участием «Контроль и профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП-2019)» (Москва, 28–29 ноября 2019 г.) **1, 102**

Акимкин В.Г. Резолюция Всероссийской научно-практической интернет-конференции с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность–2020» (Москва, 6–8 октября 2020 г.) **6, 608**

Акимкин В.Г. Резолюция Всероссийской научно-практической интернет-конференции с международным участием «Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы» (Москва, 19–20 октября 2020 г.) **6, 610**

Акимкин В.Г. Резолюция 8-го Конгресса с международным участием «Контроль и профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП-2020)» (Москва, 25–27 ноября 2020 г.) **6, 613**

Рецензии

Жирнов О.П. Рецензия на книгу академика РАН Ф.И. Ершова «История вирусологии от Д.И. Иванова до наших дней» **3, 280**

Суворов А.Н. Рецензия на монографию Boris A. Shenderov, Alexander V. Sinitsa, Mikhail M. Zakharchenko, Christine Lang «Metabiotics. Present State, Challenges and Perspectives» (Springer Nature Switzerland AG, 2020) **5, 503**

Юбилеи

К 95-летию профессора Костюковой Натальи Николаевны: 73 года служения науке **3, 281**

Некрологи

Памяти Валентины Борисовны Гервазиевой **3, 282**

Памяти Валентина Ивановича Покровского **6, 615**