

4

ИЮЛЬ – АВГУСТ

Том 99
2022

Ж
М
Э
И

ЖУРНАЛ
МИКРОБИОЛОГИИ
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И
ИММУНОБИОЛОГИИ

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

JOURNAL

OF MICROBIOLOGY
EPIDEMIOLOGY
AND
IMMUNOBIOLOGY

4

JULY – AUGUST

VOLUME 99
2022

УЧРЕДИТЕЛИ:
ФБУН ЦНИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ РОСПОТРЕБНАДЗОРА
ВСЕРОССИЙСКОЕ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО ЭПИДЕМИОЛОГОВ,
МИКРОБИОЛОГОВ И ПАРАЗИТОЛОГОВ

ЖУРНАЛ МИКРОБИОЛОГИИ, ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ИММУНОБИОЛОГИИ

(Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii)

Двухмесячный научно-практический журнал

Основан в 1924 г.

Рецензируемый «Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии» рассматривает актуальные проблемы мировой науки и обеспечивает синтез новейших результатов исследований в области микробиологии, вирусологии, эпидемиологии, вакцинологии, иммунобиологии, профилактики и контроля инфекционных заболеваний. Междисциплинарный подход дает возможность интеграции передовых научных знаний смежных специальностей, широкого видения проблем фундаментальной и прикладной инфектологии, а также комплексного подхода к созданию биомедицинских технологий. К публикации принимаются научные труды российских и зарубежных исследователей, лекции, а также методические материалы и законодательные документы в области сохранения эпидемиологического благополучия населения.

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

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

4

ИЮЛЬ – АВГУСТ

**ТОМ 99
2022**

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

Свидетельство ПИ № ФС77-75442

ISSN 0372-9311 (Print)

ISSN 2686-7613 (Online)

DOI prefix: 10.36233

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

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

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

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

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

ПОДПИСКА:

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

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

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

УЧРЕДИТЕЛИ:

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора
www.crie.ru
Всероссийское научно-практическое
общество эпидемиологов,
микробиологов и паразитологов

ИЗДАТЕЛЬ:

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

*Начальник редакционно-
издательского отдела:*
Осокина Ольга Владимировна

РЕДАКЦИЯ:

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

Заведующая редакцией:

Устинкова Ольга Владимировна

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

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

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

Подписано в печать 30.08.2022.

Формат 60×90^{1/8}. Тираж 280 экз.

Усл.-печ. л. 15,5.

Отпечатано в «Объединенный
полиграфический комплекс».

115114, Москва, Дербеневская

набережная, 7с2.

E-mail: info@opk.bz. www.opk.bz

16+

© ФБУН ЦНИИ эпидемиологии
Роспотребнадзора, 2022

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

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

Заместитель главного редактора

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

Ответственный секретарь

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Российские члены редакционной коллегии

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Миронов К.О., д.м.н., проф., академик РАН, директор, Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Bimonthly scientific and practical journal

Founded in 1924

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

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

The Journal welcomes Russian and foreign original research articles, reviews, brief reports, mini-reviews, opinions and other special featured articles as well as lectures, methodological materials related to its profile.

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

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

4

JULY–AUGUST

VOLUME 99

2022

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

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

DOI prefix: 10.36233

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

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

The CrossMark service is used.

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

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

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

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

Full texts of issues of the journal are available:

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

FOUNDERS:

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

PUBLISHER:

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

EDITORIAL OFFICE:

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

Head of the Editorial and publishing department:

Olga V. Osokina

Head of Editorial Office:
Olga V. Ustinkova

The Editorial Board is not responsible for the advertising content.

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

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

Signed to the press on August 30, 2022.
Print format 60×90^{1/8}. Circulation 280 copies.

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

© Central Research Institute for Epidemiology, 2022

EDITOR-IN-CHIEF

Vitaly V. Zverev, Dr. Sci. (Biology), RAS Full Member, Professor, Head, Department of microbiology, virology and immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Deputy Editor

Tatiana A. Semenenko, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Head, Epidemiology Department, N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Executive Secretary

Alexander E. Platonov, Professor, Dr. Sci. (Medicine), chief researcher, Laboratory of Zoonoses, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

EDITORIAL BOARD

Russian members of the Editorial Board

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

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

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

Oleg V. Bukharin, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Scientific Director of the Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch of the Academy of Sciences, Orenburg, Russia

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

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

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

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

Alexander N. Kulichenko, D. Sci. (Medicine), Professor, RAS Full Member, Director of the Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia

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

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

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

Foreign members of the Editorial Board

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

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

Michael O. Favorov, PhD, DSc (Medicine), President, DiaPrep System Inc., Atlanta, GA, United States; Chief Scientific Officer, Turklab, Turkey

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

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

EDITORIAL COUNCIL

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

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

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

Alexander N. Lukashev, 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

Victor V. Maleev, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director adviser, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow

Mikhail I. Mikhaylov, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Head, Laboratory of viral hepatitis, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Professor, Department of epidemiology, Belgorod State University, Medical Institute, Belgorod

Gennadiy G. Onishchenko, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Head, Department of Human Ecology and Environmental Health, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow

Yury V. Nesvizhsky, Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of microbiology, virology and immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

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

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

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

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

Sergey V. Cherkasov, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch of RAS, Orenburg

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

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

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

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

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

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

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

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Акимкин В.Г., Попова А.Ю., Хафизов К.Ф., Дубоделов Д.В., Углева С.В., Семенов Т.А., Плоскирева А.А., Горелов А.В., Пшеничная Н.Ю., Ежлова Е.Б., Летюшев А.Н., Демина Ю.В., Кутырев В.В., Максютин Р.А., Говорун В.М., Дятлов И.А., Толоян А.А., Куличенко А.Н., Балахонов С.В., Рудаков Н.В., Троценко О.Е., Носков А.К., Зайцева Н.Н., Топорков А.В., Лиознов Д.А., Андреева Е.Е., Микаилова О.М., Комаров А.Г., Ананьев В.Ю., Молдованов В.В., Логунов Д.Ю., Гушин В.А., Дедков В.Г., Черкашина А.С., Кузин С.Н., Тиванова Е.В., Кондрашева Л.Н., Саенко В.В., Селезов С.Ю., Гасанов Г.А., Сванадзе Н.Х., Глазов М.Б., Остроушко А.А., Миронов К.О., Есьман А.С., Осина Н.А., Боднев С.А., Комиссаров А.Б., Даниленко Д.М., Богун А.Г., Скрябин Ю.П., Лопатовская К.В., Штрек С.В., Волынкина А.С., Гладких А.С., Котова В.О., Водопьянов А.С., Новикова Н.А., Сперанская А.С., Самойлов А.Е., Неверов А.Д., Шпак И.М. COVID-19: эволюция пандемии в России. Сообщение II: динамика циркуляции геновариантов вируса SARS-CoV-2*	382
Файзуллоев Е.Б., Корчевая Е.Р., Грачева А.В., Самойликов Р.В., Смирнова Д.И., Соколова О.С., Глухов Г.С., Моисеенко А.В., Ленева И.А., Нагиева Ф.Г., Свитич О.А., Зверев В.В. Биологическая характеристика холодоадаптированных вариантов коронавируса SARS-CoV-2*	397
Соболева Е.Г., Ковалев Е.В., Слись С.С., Пичурина Н.Л., Кононенко А.А., Сокиркина Е.Н., Носков А.К. Особенности распространения новой коронавирусной инфекции на территории муниципальных образований Ростовской области	410
Захарова Ю.В., Отдушкина Л.Ю., Марковская А.А., Несвижский Ю.В., Афанасьев С.С., Леванова Л.А. Исследование <i>in vitro</i> механизмов взаимодействия грибов <i>Candida albicans</i> с <i>Klebsiella pneumoniae</i> и <i>Enterococcus faecalis</i> , выделенных из кишечного микробиома ВИЧ-инфицированных пациентов*	420
Годовалов А.П., Николаева Н.В., Карпунина Т.И., Оборин Д.А. К оценке этиологической значимости бактерий, детектированных в генитальном тракте мужчин	428
Пай Г.В., Ракитина Д.В., Сухина М.А., Юдин С.М., Макаров В.В., Маня Т.Р., Загайнова А.В. Оценка наличия генов, связанных с вирулентностью, у изолятов <i>Klebsiella pneumoniae</i> , выделенных из микробиоты больных и «практически» здоровых людей, с применением метода мультиплексной полимеразной цепной реакции	436
Савлевич Е.Л., Егоров В.И., Савушкина Е.Ю., Зурочка А.В., Герасимов А.Н., Митрофанова Е.С., Любимова Е.В. Изучение микробных факторов при обострении полипозного риносинусита	445
Алексеева Е.А., Полосенко О.В., Фурсова Н.К., Асташкин Е.И., Борзенков В.Н., Кисличкина А.А., Коломбет Л.В., Шепелин А.П., Миронов А.Ю. Первый случай выявления <i>Listeria monocytogenes</i> сиквенс-типов ST7, ST20, ST425 в сточных водах при обследовании водных объектов Вологодской области	453
Монахова Е.В., Водопьянов А.С., Кругликов В.Д., Селянская Н.А., Писанов Р.В., Носков А.К. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов <i>Vibrio cholerae</i> nonO1/nonO139, выделенных от больных отитами на территории Российской Федерации	465
Филатов Ф.П. Нуклеотидные тетрамеры TCGA и CTAG: вирусные ДНК и генетический код (гипотеза)*	478
НЕКРОЛОГИ	
Памяти Айрата Радиковича Мавзютова (3 февраля 1962 года – 28 июля 2022 года)	494
ЮБИЛЕИ	
К 85-летию академика РАН Олега Валерьевича Бухарина	496
ХРОНИКА	
XII Съезд Общероссийской общественной организации «Всероссийское научно-практическое общество эпидемиологов, микробиологов и паразитологов»	498

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

CONTENTS

ORIGINAL RESEARCHES

Akimkin V.G., Popova A.Yu., Khafizov K.F., Dubodelov D.V., Ugleva S.V., Semenenko T.A., Ploskireva A.A., Gorelov A.V., Pshenichnaya N.Yu., Ezhlova E.B., Letyushev A.N., Demina Yu.V., Kutyrev V.V., Maksyutov R.A., Govorun V.M., Dyatlov I.A., Totolyan A.R., Kulichenko A.N., Balakhonov S.V., Rudakov N.V., Troczenko O.E., Noskov A.K., Zajczeva N.N., Toporkov A.V., Lioznov D.A., Andreeva E.E., Mikailova O.M., Komarov A.G., Ananov V.Yu., Moldovanov V.V., Logunov D.Yu., Gushhin V.A., Dedkov V.G., Cherkashina A.S., Kuzin S.N., Tivanova E.V., Kondrasheva L.Yu., Saenko V.V., Selezov S.Yu., Gasanov G.A., Svanadze N.Kh., Glazov M.B., Ostroushko A.A., Mironov K.O., Esmen A.S., Osina N.A., Bodnev S.A., Komissarov A.B., Danilenko D.M., Bogun A.G., Skryabin Yu.P., Lopatovskaya K.V., Shtrek S.V., Volynkina A.S., Gladkikh A.S., Kotova V.O., Vodopyanov A.S., Novikova N.A., Speranskaya A.S., Samojlov A.E., Neverov A.D., Shpak I.M. COVID-19: evolution of the pandemic in Russia. Report II: dynamics of the circulation of SARS-CoV-2 genetic variants*	382
Faizuloev E.B., Korchevaya E.R., Gracheva A.V., Samoilkov R.V., Smirnova D.I., Sokolova O.S., Glukhov G.S., Moiseenko A.V., Leneva I.A., Nagieva F.G., Svitich O.A., Zverev V.V. Biological characterization of cold-adapted SARS-CoV-2 variants*	397
Soboleva E.G., Kovalev E.V., Slis S.S., Pichurina N.L., Kononenko A.A., Sokirkina E.N., Noskov A.K. Features of the spread of a new coronavirus infection in the territory of municipalities of the Rostov region	410
Zakharova Yu.V., Otdushkina L.Yu., Markovskaya A.A., Nesvizhsky Y.V., Afanasiev S.S., Levanova L.A. An <i>in vitro</i> study of interactions of <i>Candida albicans</i> with <i>Klebsiella pneumoniae</i> and <i>Enterococcus faecalis</i> isolated from intestinal microbiome of HIV infected patients*	420
Godovalov A.P., Nikolaeva N.V., Karpunina T.I., Oborin D.A. On the assessment of the etiological significance of bacteria detected in the male genital tract	428
Pay G.V., Rakitina D.V., Sukhina M.A., Yudin S.M., Makarov V.V., Maniya T.R., Zagaynova A.V. Multiplex PCR screening for virulence genes of <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolated from microbiota of diseased and healthy people	436
Savlevich E.L., Egorov V.I., Savushkina E.Yu., Zurochka A.V., Gerasimov A.N., Mitrofanova E.S., Lyubimova E.V. Study of microbial factors in exacerbation of chronic rhinosinusitis with nasal polyps	445
Alekseeva E.A., Polosenko O.V., Fursova N.K., Astashkin E.I., Borzenkov V.N., Kislichkina A.A., Kolombet L.V., Shepelin A.P., Mironov A.Yu. The first case of detection of <i>Listeria monocytogenes</i> sequence types ST7, ST20, ST425 in wastewater during an investigation of water bodies in the Vologda region	453
Monakhova E.V., Vodop'yanov A.S., Kruglikov V.D., Selyanskaya N.A., Pisanov R.V., Noskov A.K. Molecular genetic characteristics of <i>Vibrio cholerae</i> nonO1/nonO139 strains isolated on the territory of Russian Federation from patients with otitis	465
Filatov F.P. Nucleotide tetramers TCGA and CTAG: viral DNA and the genetic code (hypothesis)*	478
OBITUARIES	
In memory of Airat Radikovich Mavzyutov (February 3, 1962 – July 28, 2022)	494
ANNIVERSARIES	
To the 85 th anniversary of Academician of the Russian Academy of Sciences Oleg Valerievich Bukharin	496
CHRONICLE	
XII Congress of the All-Russian Public Organization "All-Russian Scientific and Practical society of epidemiologists, microbiologists and parasitologists"	498

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-295>



COVID-19: эволюция пандемии в России. Сообщение II: динамика циркуляции геновариантов вируса SARS-CoV-2

Акимкин В.Г.¹, Попова А.Ю.², Хафизов К.Ф.¹, Дубоделов Д.В.¹, Углева С.В.¹[✉], Семененко Т.А.³, Плоскирева А.А.¹, Горелов А.В.¹, Пшеничная Н.Ю.¹, Ежлова Е.Б.², Летюшев А.Н.², Демина Ю.В.², Кутырев В.В.⁴, Максютов Р.А.⁵, Говорун В.М.⁶, Дятлов И.А.⁷, Тотолян А.А.⁸, Куличенко А.Н.⁹, Балахонов С.В.¹⁰, Рудаков Н.В.¹¹, Троценко О.Е.¹², Носков А.К.¹³, Зайцева Н.Н.¹⁴, Топорков А.В.¹⁵, Лиознов Д.А.¹⁶, Андреева Е.Е.¹⁷, Микаилова О.М.¹⁸, Комаров А.Г.¹⁹, Ананьев В.Ю.²⁰, Молдованов В.В.²¹, Логунов Д.Ю.³, Гушин В.А.³, Дедков В.Г.⁸, Черкашина А.С.¹, Кузин С.Н.¹, Тиванова Е.В.¹, Кондрашева Л.Н.¹, Саенко В.В.¹, Селезов С.Ю.¹, Гасанов Г.А.¹, Сванадзе Н.Х.¹, Глазов М.Б.¹, Остроушко А.А.¹, Миронов К.О.¹, Есьман А.С.¹, Осина Н.А.⁴, Боднев С.А.⁵, Комиссаров А.Б.¹⁶, Даниленко Д.М.¹⁶, Богун А.Г.⁷, Скрыбин Ю.П.⁷, Лопатовская К.В.¹⁰, Штрек С.В.¹¹, Волынкина А.С.⁹, Гладких А.С.⁸, Котова В.О.¹², Водопьянов А.С.¹³, Новикова Н.А.¹⁴, Сперанская А.С.⁶, Самойлов А.Е.⁶, Неверов А.Д.¹, Шпак И.М.¹⁵

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

²Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Россия;

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

⁴Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия;

⁵Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Россия;

⁶Институт дезинфектологии, Москва, Россия;

⁷Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Россия;

⁸Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

⁹Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт, Ставрополь, Россия;

¹⁰Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока, Иркутск, Россия;

¹¹Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций, Омск, Россия;

¹²Хабаровский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии, Хабаровск, Россия;

¹³Ростовский-на-Дону противочумный институт, Ростов-на-Дону, Россия;

¹⁴Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия;

¹⁵Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт, Волгоград, Россия;

¹⁶Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия;

¹⁷Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по городу Москве, Москва, Россия;

¹⁸Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Московской области, Москва, Россия;

¹⁹Диагностический центр (Центр лабораторных исследований) Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия;

²⁰Федеральный центр гигиены и эпидемиологии, Москва, Россия;

²¹Центр гигиены и эпидемиологии в городе Москве, Москва, Россия

Аннотация

Актуальность. Продолжающаяся пандемия новой коронавирусной инфекции (COVID-19) определяет актуальность проведения молекулярного-генетического мониторинга распространения SARS-CoV-2 среди населения Российской Федерации.

Цель работы — анализ динамики циркуляции геновариантов вируса SARS-CoV-2 на территории России. **Материалы и методы.** Проведён анализ динамики циркуляции геновариантов вируса SARS-CoV-2 с 28.12.2020 по 26.06.2022 на территории России. Используются материалы отчёта Роспотребнадзора № 970 «Информация о случаях инфекционных заболеваний у лиц с подозрением на новую коронавирусную инфекцию», Российской платформы агрегации информации о геномах вирусов (VGARus). Наличие РНК SARS-CoV-2 было подтверждено методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с обратной транскрипцией. Для проведения амплификации фрагментов генома и последующего секвенирования использовались разработанные в ЦНИИ Эпидемиологии праймерные панели.

Результаты и обсуждение. С помощью российской платформы VGARus, развёрнутой на базе ЦНИИ Эпидемиологии, получены данные о мутационной изменчивости SARS-CoV-2. Мониторинг циркуляции геновариантов SARS-CoV-2 на территории России с 28.12.2020 по 26.06.2022 выявил доминирование геновариантов Delta и Omicron на различных этапах эпидемии.

Заключение. Данные молекулярно-генетических исследований являются важнейшим компонентом эпидемиологического надзора для принятия управленческих решений по предотвращению дальнейшего распространения SARS-CoV-2 и формируют основу для создания новых вакцинных препаратов.

Ключевые слова: COVID-19, заболеваемость, эпидемический процесс, SARS-CoV-2, секвенирование, геновариант

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическими комитетами ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (протокол № 3 от 27.03.2020).

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

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

Для цитирования: Акимкин В.Г., Попова А.Ю., Хафизов К.Ф., Дубоделов Д.В., Углева С.В., Семененко Т.А., Плоскирева А.А., Горелов А.В., Пшеничная Н.Ю., Ежлова Е.Б., Летюшев А.Н., Демина Ю.В., Кутырев В.В., Максютов Р.А., Говорун В.М., Дятлов И.А., Тотолян А.А., Куличенко А.Н., Балахонов С.В., Рудаков Н.В., Троценко О.Е., Носков А.К., Зайцева Н.Н., Топорков А.В., Лioзнов Д.А., Андреева Е.Е., Микаилова О.М., Комаров А.Г., Ананьев В.Ю., Молдованов В.В., Логунов Д.Ю., Гуцин В.А., Дедков В.Г., Черкашина А.С., Кузин С.Н., Тиванова Е.В., Кондрашева Л.Н., Саенко В.В., Селезов С.Ю., Гасанов Г.А., Сванадзе Н.Х., Глазов М.Б., Остроушко А.А., Миронов К.О., Есьман А.С., Осина Н.А., Боднев С.А., Комиссаров А.Б., Даниленко Д.М., Богун А.Г., Скрыбин Ю.П., Лопатовская К.В., Штрек С.В., Волынкина А.С., Гладких А.С., Котова В.О., Водопьянов А.С., Новикова Н.А., Сперанская А.С., Самойлов А.Е., Неверов А.Д., Шпак И.М. COVID-19: эволюция пандемии в России. Сообщение II: динамика циркуляции геновариантов вируса SARS-CoV-2. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(4):381–396.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-295>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-295>

COVID-19: evolution of the pandemic in Russia. Report II: dynamics of the circulation of SARS-CoV-2 genetic variants

Vasily G. Akimkin¹, Anna Yu. Popova², Kamil F. Khafizov¹, Dmitry V. Dubodelov¹, Svetlana V. Ugleva¹✉, Tatyana A. Semenenko³, Antonina A. Ploskireva¹, Alexander V. Gorelov¹, Natalia Yu. Pshenichnaya¹, Elena B. Yezhlova², Alexander N. Letyushev², Yulia V. Demina², Vladimir V. Kutyrev⁴, Rinat A. Maksyutov⁵, Vadim M. Govorun⁶, Ivan A. Dyatlov⁷, Areg A. Totolian⁸, Alexandr N. Kulichenko⁹, Sergey V. Balakhonov¹⁰, Nikolay V. Rudakov¹¹, Olga E. Trotsenko¹², Alexey K. Noskov¹³, Natalia N. Zaitseva¹⁴, Andrey V. Toporkov¹⁵, Dmitry A. Lioznov¹⁶, Elena E. Andreeva¹⁷, Olga M. Mikailova¹⁸, Andrey G. Komarov¹⁹, Vasily Yu. Ananyev²⁰, Vladimir V. Moldovanov²¹, Denis Yu. Logunov³, Vladimir A. Gushchin³, Vladimir G. Dedkov⁸, Anna S. Cherkashina¹, Stanislav N. Kuzin¹, Elena V. Tivanova¹, Larisa Yu. Kondrasheva¹, Valeria V. Saenko¹, Semyon Yu. Selezov¹, Gasan A. Gasanov¹, Nino Kh. Svanadze¹, Maxim B. Glazov¹, Aleksey A. Ostroushko¹, Konstantin O. Mironov¹, Anna S. Esman¹, Natalia A. Osina⁴, Sergei A. Bodnev⁵, Andrey B. Komissarov¹⁶, Daria M. Danilenko¹⁶, Aleksandr G. Bogun⁷, Yuriy P. Skryabin⁷, Kristina V. Lopatovskaya¹⁰, Sergey V. Shtrek¹¹, Anna S. Volynkina⁹, Anna S. Gladkikh⁸, Valeria O. Kotova¹², Alexey S. Vodopyanov¹³, Nadezhda A. Novikova¹⁴, Anna S. Speranskaya⁶, Andrey E. Samojlov⁶, Alexey D. Neverov¹, Ivan M. Shpak¹⁵

- ¹Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia;
²Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russia;
³National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia;
⁴Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia;
⁵State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia;
⁶Institute of Disinfectology, Moscow, Russia;
⁷State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia;
⁸Pasteur St. Petersburg Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russia;
⁹Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia;
¹⁰Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and the Far East, Irkutsk, Russia;
¹¹Omsk Research Institute of Natural Focal Infections, Omsk, Russia;
¹²Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russia;
¹³Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russia;
¹⁴Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia;
¹⁵Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd, Russia;
¹⁶Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia;
¹⁷Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare for the City of Moscow, Moscow, Russia;
¹⁸Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare in the Moscow Region, Moscow, Russia;
¹⁹Diagnostic Center (Center for Laboratory Research) of the Department of Health of the City of Moscow, Moscow, Russia;
²⁰Federal Center for Hygiene and Epidemiology, Moscow, Russia;
²¹Center for Hygiene and Epidemiology in the City of Moscow, Moscow, Russia

Abstract

Background. The ongoing pandemic of the novel coronavirus infection (COVID-19) draws attention to the significance of molecular and genetic monitoring of the SARS-CoV-2 spread among the population of the Russian Federation.

The **aim** of the study was to analyze the dynamics of circulation of SARS-CoV-2 genetic variants in Russia.

Materials and methods. The analysis of the circulation dynamics for SARS-CoV-2 genetic variants in Russia was carried out, covering the period from 28/12/2020 to 26/6/2022. The analysis included the data from Rospotrebnadzor Report No. 970 "Information about Infectious Diseases in Individuals with Suspected Novel Coronavirus Infection" and the Virus Genome Aggregator of Russia (VGARus). The presence of SARS-CoV-2 RNA was confirmed by the real-time reverse transcription polymerase chain reaction. The primer panels developed at the Central Research Institute of Epidemiology were used for amplification of genomic fragments and the subsequent sequencing.

Results and discussion. Using the Russian VGARus platform developed by the Central Research Institute of Epidemiology, we received the data on mutational variability of SARS-CoV-2. By monitoring the circulation of SARS-CoV-2 genetic variants in Russia from 28/12/2020 to 26/6/2022, we found that Delta and Omicron genetic variants prevailed at different stages of the epidemic.

Conclusion. The data of molecular and genetic studies are an essential component of epidemiological surveillance, being critically important for making executive decisions aimed at prevention of further spread of SARS-CoV-2 and laying the groundwork for creating new vaccines.

Keywords: COVID-19, incidence, epidemic process, SARS-CoV-2, sequencing, genetic variant

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Central Research Institute for Epidemiology (protocol No. 3, March 27, 2020).

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

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

For citation: Akimkin V.G., Popova A.Yu., Khafizov K.F., Dubodelov D.V., Ugleva S.V., Semenenko T.A., Ploskireva A.A., Gorelov A.V., Pshenichnaya N.Yu., Ezhlova E.B., Letyushev A.N., Demina Yu.V., Kutyrev V.V., Maksyutov R.A., Govorun V.M., Dyatlov I.A., Totolyan A.R., Kulichenko A.N., Balakhonov S.V., Rudakov N.V., Troczenko O.E., Noskov A.K., Zajczeva N.N., Toporkov A.V., Lioznov D.A., Andreeva E.E., Mikailova O.M., Komarov A.G., Ananov V.Yu., Moldovanov V.V., Logunov D.Yu., Gushhin V.A., Dedkov V.G., Cherkashina A.S., Kuzin S.N., Tivanova E.V., Kondrasheva L.Yu., Saenko V.V., Selezov S.Yu., Gasanov G.A., Svanadze N.Kh., Glazov M.B., Ostroushko A.A., Mironov K.O., Esman A.S., Osina N.A., Bodnev S.A., Komissarov A.B., Danilenko D.M., Bogun A.G., Skryabin Yu.P., Lopatovskaya K.V., Shtrek S.V., Volynkina A.S., Gladkikh A.S., Kotova V.O., Vodopyanov A.S., Novikova N.A., Speranskaya A.S., Samojlov A.E., Neverov A.D., Shpak I.M. COVID-19: evolution of the pandemic in Russia. Report II: dynamics of the circulation of SARS-CoV-2 genetic variants. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(4):381–396.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-295>

Введение

Интенсивное развитие эпидемического процесса новой инфекции COVID-19 (Corona Virus Disease 2019), этиологически связанной с коронавирусом SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2), в глобальном масштабе создало благоприятные эволюционные условия для появления генетических вариантов возбудителя, которые приобретают новые патогенные свойства. Этому направлению эволюции SARS-CoV-2 способствуют, с одной стороны, преимущества тех вариантов возбудителя, которые активнее передаются от человека к человеку, и, с другой, — ограничение распространения вариантов вируса, которые вызывают более тяжёлое клиническое течение и, соответственно, госпитализацию пациентов, что уменьшает число эффективных контактов. Следует подчеркнуть, что на современном этапе эпидемический процесс COVID-19 в мире находится в состоянии неустойчивого динамического равновесия и даже незначительное увеличение трансмиссивности возбудителя, при прочих равных условиях, способно привести к росту заболеваемости [1–7].

Как и другие РНК-вирусы, SARS-CoV-2, адаптируясь к своим новым хозяевам — людям, подвержен генетической эволюции, что приводит к мутациям в вирусном геноме, которые могут изменять патогенный потенциал вируса. В связи с продолжающимся появлением множества вариантов SARS-CoV-2 Центр по контролю и профилактике заболеваний США и Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) независимо друг от друга создали системы классификации для разделения возникающих мутаций вируса на несколько подгрупп на основании их влияния на трансмиссивность, летальность и ответ на терапию.

Хотя между этими двумя классификациями имеются различия, в некотором приближении к первой группе вариантов, вызывающих озабоченность (variants of concern — VOCs), можно отнести те, которые имеют ряд доказанных признаков, таких как повышенная контагиозность, тяжёлое течение заболевания, увеличение числа летальных исходов и значительное снижение нейтрализации антителами, образовавшимися в ответ на предыдущую инфекцию или вакцинацию. На текущий момент к указанному классу, согласно классификации ВОЗ, принадлежат варианты Delta (B.1.617.2) и Omicron (B.1.1.529)¹. Ко второй группе штаммов, представляющих интерес (variants of interest — VOIs), относят варианты со специфическими генетическими маркерами, ассоциированными с изменениями в связывании с рецепторами, ослаблением нейтрали-

зации антителами, увеличением трансмиссивности, снижением эффективности лечения с прогнозируемым нарастанием тяжести заболевания. В третью группу входят варианты под наблюдением (variants under monitoring — VUM), для которых имеются данные, указывающие на потенциальное влияние на скорость передачи вируса и эффективность лечения, но их доля со временем снизилась до практически нулевого уровня. В классификации Центра по контролю и профилактике заболеваний США существует ещё одна категория — варианты с серьёзными последствиями (variant of high consequence — VоHC), для которых присутствуют убедительные доказательства того, что имеющиеся стратегии диагностики, профилактики и лечения гораздо менее эффективны, чем для ранее циркулирующих форм. Однако на сегодняшний день отсутствуют штаммы, обозначенные как VоHC². В настоящее время во всём мире эти аббревиатуры стали новыми устойчивыми понятиями определения вариантов коронавируса, вызывающего COVID-19.

Чрезвычайно важной является оценка динамики распространения известных и новых геновариантов SARS-CoV-2, циркулирующих на территории России. В соответствии с Постановлением Правительства РФ от 23.03.2021 № 448 «Об утверждении Временного порядка предоставления данных расшифровки генома возбудителя новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» в ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора разработана и введена в действие Российская платформа агрегации информации о геномах вирусов (Virus Genome Aggregator of Russia — VGARus)³. База данных VGARus содержит информацию о нуклеотидных последовательностях вирусов SARS-CoV-2 и их мутациях, распространённых в тех или иных регионах России, и может быть использована для хранения, систематизации и выборки данных для выявления мутаций и определения штаммов вирусов.

VGARus даёт возможность постоянно вести мониторинг мутационной изменчивости SARS-CoV-2, предоставляя важнейшие данные для обнаружения новых геновариантов и отслеживания их распространённости на территории России. Молекулярно-генетические исследования являются основой для принятия управленческих решений в области профилактических и противоэпидемических мероприятий по предотвращению дальнейшего распространения SARS-CoV-2 и формируют платформу для создания новых вакцинных препаратов [8–10].

¹ ВОЗ. Отслеживание вариантов вируса SARS-CoV-2; 2021. URL: <https://www.who.int/ru/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/tracking-SARS-CoV-2-variants>

² CDC. SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions; 2022.

URL: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html>

³ Проект VGARus (Virus Genome Aggregator of Russia). URL: <https://genome.cric.ru/app/index>

Цель — анализ динамики циркуляции геновариантов вируса SARS-CoV-2 на территории России.

Материалы и методы

Исследование выполнено в ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Проведён анализ динамики циркуляции геновариантов вируса SARS-CoV-2 с 28.12.2020 по 24.04.2022 на территории России. Информация о пациентах извлечена из базы данных, сформированной на основе материалов формы отчёта Роспотребнадзора № 970 «Информация о случаях инфекционных заболеваний у лиц с подозрением на новую коронавирусную инфекцию». Указанным пациентам присвоен код МКБ-10 U07.1 «COVID-19, вирус идентифицирован»: COVID-19 подтверждён лабораторными исследованиями, независимо от тяжести клинических признаков или симптомов. В исследовании использовали материалы национальной платформы по агрегации данных о геномах SARS-CoV-2 — VGARus, Централизованной базы данных для построения эпидемиологической аналитики по новой коронавирусной инфекции (COVID-19) и программы для ЭВМ «Эпидемиологическая аналитика по новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» [11, 12].

Лабораторные исследования проводили в соответствии с МР 3.1.0169-20 «Лабораторная диагностика COVID-19» и другими нормативными документами. Биологическим материалом для исследования являлись мазки из носа, носоглотки и/или горла, промывные воды бронхов, полученные при фибробронхоскопии (бронхоальвеолярный лаваж), (эндо)трахеальный, назофарингеальный аспират, мокрота, биопсийный или аутопсийный материал дыхательных путей.

Наличие РНК SARS-CoV-2 подтверждено методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с применением тест-систем АмплиСенс® Cov-Bat-FL (№ РЗН 2014/1987 от 07.04.2020) и на основе LAMP АмплиСенс® SARS-CoV-2 (№ РЗН 2021/13357 от 03.02.2021). Для количественного определения РНК SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР использован набор реагентов АмплиСенс® COVID-19-FL (№ РЗН 2021/14026 от 09.04.2021). Секвенирование в ЦНИИ Эпидемиологии осуществлялось на платформе «Illumina MiSeq» с использованием реагентов MiSeq Reagent Kit v2 (PE 150 + 150 или PE 250 + 250 циклов) или MiSeq Reagent Kit v3 (PE 300 + 300 циклов), а также «Illumina NextSeq 2000» с использованием реагентов NextSeq 1000/2000 P2 (300 циклов) v3. Все последовательности, полученные в исследовании, загружены в базу данных VGARus. Помимо указанных подходов, другими организациями, участвующими в наполнении базы данных VGARus, использовались иные методы ам-

плификации нуклеиновых кислот и технологии высокопроизводительного секвенирования.

Для статистической обработки использованы стандартные методы описательной статистики «Microsoft Excel» и «Statistica v.12.0» («StatSoft»).

Результаты

В рамках Постановления Правительства РФ от 23.03.2021 № 448 образован Консорциум, в состав которого входят научные организации Роспотребнадзора, а также научные организации других ведомств. На сегодняшний день к системе подключена 131 организация, из них 40 выполняют секвенирование [13].

В результате реализации указанного Постановления удалось создать ресурс, уникальный по охвату территории страны и полноте сопроводительной информации, включающей сведения, необходимые для эпидемиологического анализа. Алгоритм работы с данными VGARus позволяет осуществлять оперативный и ретроспективный анализ распространения генетических вариантов SARS-CoV-2 с учётом новейших сведений о генетическом разнообразии возбудителя COVID-19.

В настоящее время проводится регулярный мониторинг эволюции вируса с целью своевременного реагирования на появление его новых потенциально опасных вариантов и корректировки мер для предотвращения распространения COVID-19. Обязательная регистрация проводится в соответствии с Постановлением Правительства РФ № 448 «Об утверждении Временного порядка предоставления данных расшифровки генома возбудителя новой коронавирусной инфекции (COVID-19)».

Специалистами ЦНИИ Эпидемиологии созданы биоинформатические средства анализа данных для выявления мутаций и отображения их принадлежности к эпидемиологически значимым штаммам. Продолжается депонирование данных секвенирования, включая метаданные.

Регистрируемые в базе клинические образцы автоматически получают внутренний регистрационный номер, затем к информации об образце добавляют результат секвенирования нуклеотидной последовательности варианта SARS-CoV-2. Запущенные в базе данных алгоритмы в автоматическом режиме проводят анализ мутаций и идентификацию варианта SARS-CoV-2 в каждом образце. После загрузки нуклеотидной последовательности вируса система автоматически запускает процесс валидации сиквенса, анализ принадлежности к тому или иному геноварианту, а также (в случае, если это полный геном) определяет геновариант по системе Pangolin. Платформа собирает информацию из разных источников: VGARus, эпидемиологические данные Роспотребнадзора, данные с портала «СтопКоронавирус», ВОЗ, демографические и со-

циальные данные по России (статистика, справочники). Помимо этого, в рамках платформы VGARus разработан модуль «Эпидемиологическая аналитика по новой коронавирусной инфекции», который позволяет анализировать в реальном времени данные, загруженные на платформу VGARus.

Динамический мониторинг мутационной изменчивости коронавирусов, выявленных на территории России, осуществляется с декабря 2020 г., при обнаружении первого случая завоза (28.12.2020) геноварианта Alpha (B.1.1.7).

По данным национальной базы VGARus, зарегистрировано 130 355 последовательностей вируса SARS-CoV-2, из них 67 451 (51,7%) полногеномный сиквенс, 62 904 (48,3%) фрагментных сиквенса.

Среди загруженных в базу VGARus последовательностей 112 344 (86,2%) относятся по классификации ВОЗ (согласно пересмотру классификации от 26.11.2021) к вариантам VOCs. Каждый из этих вариантов отличается от Уханьского специфичным на-

бором мутаций, из них к варианту Alpha относятся 1217 (0,9%) последовательностей, Beta — 94 (< 1%), Gamma — 26 (< 1%), Delta — 58 530 (44,9%), Omicron — 52 477 (40,2%). Не относятся к вариантам VOCs 18 011 (13,8%) загруженных последовательностей.

Геновариант Alpha был распространён на территории России зимой 2021 г. Геноварианты Beta и Gamma также встречались в начале 2021 г., однако заметного распространения не получили. Геновариант Delta распространился на территории страны во второй половине апреля 2021 г. и превалировал до января 2022 г. Геновариант Omicron обнаружен в стране в декабре 2021 г. и с января 2022 г. является доминирующим на территории России. Динамика выявленных геновариантов SARS-CoV-2 за 2020–2022 гг. и заболеваемость населения COVID-19 (на 100 тыс. населения) на территории РФ представлены на **рис. 1**.

В результате полногеномного секвенирования с 30.03.2020 по 26.06.2022 на платформу VGARus

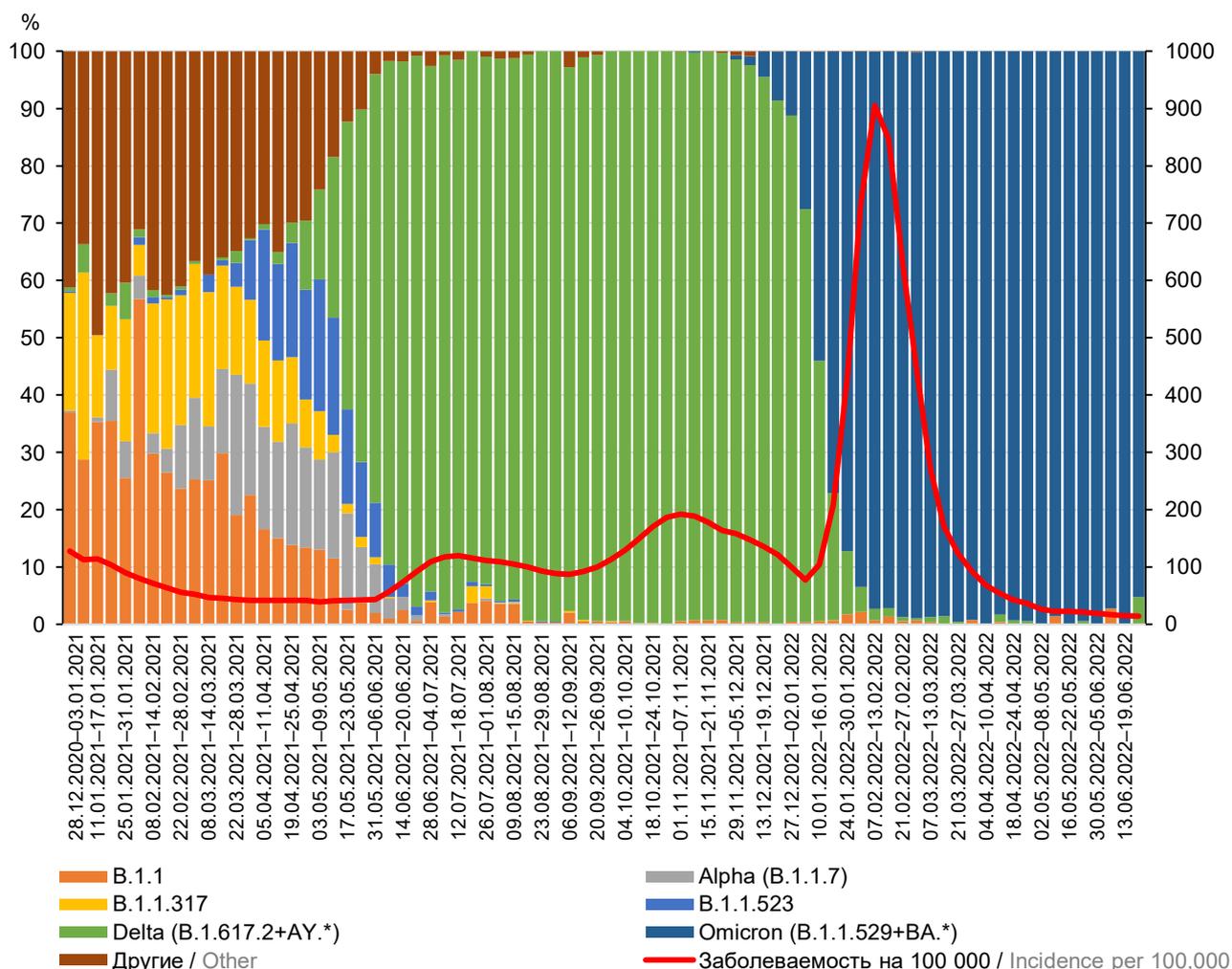


Рис. 1. Динамика геновариантов SARS-CoV-2 и заболеваемость населения COVID-19 (на 100 тыс. населения) на территории России (2020–2022 гг.).

Fig. 1. Dynamics of genetic variants of SARS-CoV-2 and COVID-19 incidence rates (per 100,000 population) in Russia (2020–2022).

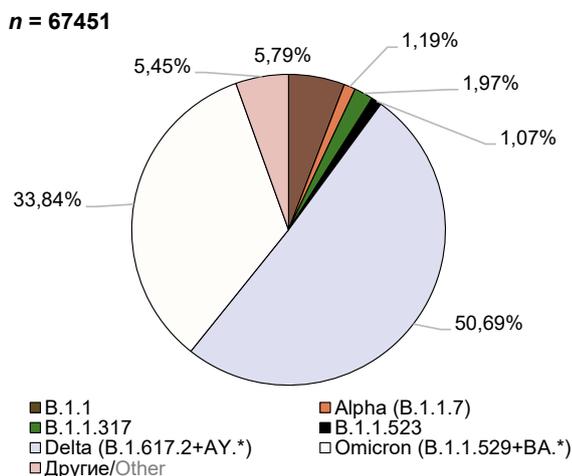


Рис. 2. Структура геновариантов в образцах биоматериала с датой забора с 28.12.2020 по 26.06.2022.

Fig. 2. The distribution of genetic variants in biomaterial specimens collected from 28/12/2020 to 26/6/2022.

загружен 67 451 идентифицированный образец. Из них 724 (1,07%) образца классифицированы как геновариант B.1.1.523, 1329 (1,97%) — B.1.1.317, 3903 (5,79%) — B.1.1, 802 (1,19%) — Alpha (B.1.1.7), 3678 (5,45%) — другие геноварианты, 22818 (33,83%) — Omicron (B.1.1.529+BA.*), 34 197 (50,69%) образцов — Delta (B.1.617.2+AY.*) (рис. 2).

Распределение геновариантов вируса SARS-CoV-2 по периодам эпидемического роста заболеваемости COVID-19 на территории России за 2020–2022 гг., свидетельствующее о доминировании геновариантов Delta (B.1.617.2+AY.*) и Omicron (B.1.1.529+BA.*), отражено в табл. 1.

Генетический вариант Delta (B.1.617.2+AY.*) с мая по декабрь 2021 г. превалировал на территории РФ, его доля среди выявленных вариантов составляла до 100%. Доминирующим во все месяцы наблюдения с момента начала регистрации геноварианта Delta являлся вариант, которому с 26.11.2021 классификатор Pangolin присвоил название AY.122 (83,3%).

Помимо AY.122 наиболее часто встречались такие субварианты Delta, как «материнский» B.1.617.2 (9,1%), AY.126 (3,0%) и др. Прочие субварианты представлены единичными образцами и составляли суммарно 4,6% от всех последовательностей Delta (рис. 3).

Всего на территории России выделено 30 сублиний геноварианта Delta, 5% проанализированных полных геномов линии Delta (B.1.617.2+AY.*) представлены на рис. 4.

При анализе динамики субвариантов линии Delta (B.1.617.2+AY.*), выделенных в России, по данным национальной базы VGARus, надо отметить, что в мае 2021 г. линия Delta в основном была

Таблица 1. Распределение геновариантов вируса SARS-CoV-2 по периодам эпидемического роста заболеваемости COVID-19 на территории России (2020–2022 гг.)

Table 1. Distribution of SARS-CoV-2 genetic variants by periods of the epidemic increase in the COVID-19 incidence in Russia (2020–2022)

Период Period	Число образцов Number of samples	Геноварианты, абс. (%) / Genovariants, abs. (%)						
		B.1.1	B.1.1.317	B.1.1.523	Alpha (B.1.1.7)	Delta (B.1.617.2+AY.*)	Omicron (B.1.1.529+BA.*)	другие other
I период I period 30.03.2020– 30.08.2020	1701	1056 (62,08)	55 (3,28)	–	–	–	–	590 (34,69)
II период II period 31.08.2020– 09.05.2021	7417	2497 (33,67)	1202 (16,21)	378 (5,10)	536 (7,23)	121 (1,63)	–	2683 (36,17)
III период III period 10.05.2021– 12.09.2021	10 602	126 (1,19)	67 (0,63)	345 (3,25)	266 (2,51)	9502 (89,62)	–	296 (2,79)
IV период IV period 19.09.2021– 09.01.2022	23 315	21 (0,09)	2 (0,009)	1 (0,004)	–	21 795 (93,48)	1420 (6,09)	76 (0,33)
V период V period 10.01.2022– 26.06.2022	24 416	203 (0,83)	3 (0,012)	–	–	2779 (11,38)	21 398 (87,64)	33 (0,14)
Всего Total	67 451	3903 (5,79)	1329 (1,97)	724 (1,07)	802 (1,19)	34 197 (50,69)	22 818 (33,83)	3678 (5,45)

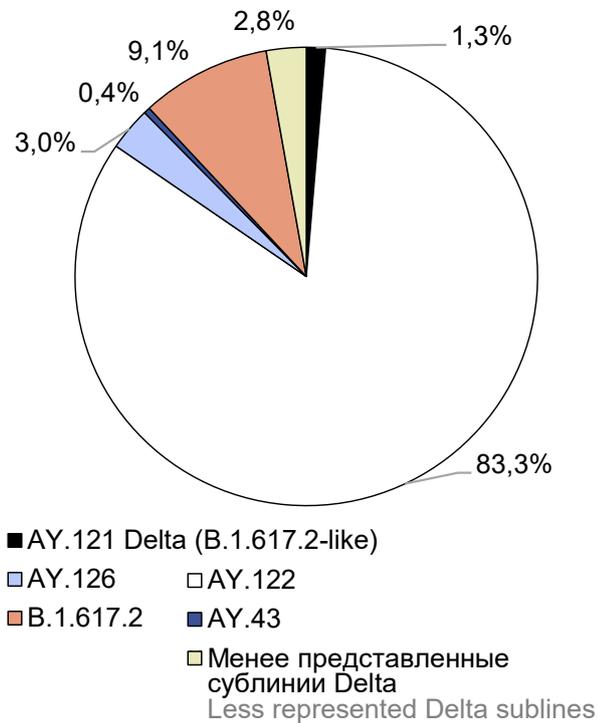


Рис. 3. Структура субвариантов линии «Delta» (B.1.617.2+AY.*), выделенных в России.

Fig. 3. Subvariants of the Delta lineage (B.1.617.2+AY.*) isolated in Russia.

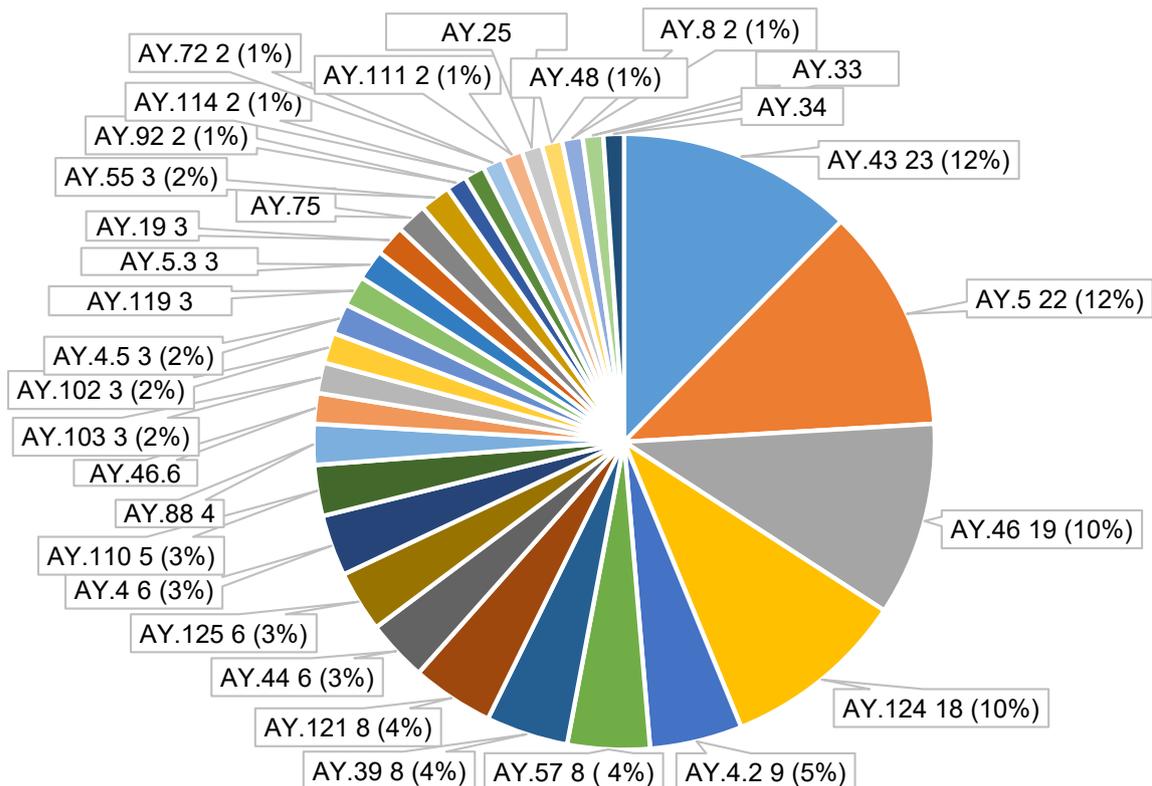


Рис. 4. Структура субвариантов линии B.1.617.2. (Delta), за исключением базового варианта B.1.617.2 и субвариантов AY.122, AY.126, AY.121, AY.43, выделенных в России.

Fig. 4. Subvariants of the B.1.617.2. (Delta) lineage, except for basic variant B.1.617.2 and subvariants AY.122, AY.126, AY.121, AY.43 isolated in Russia.

представлена сублиниями B.1.617.2 (38,7%), AY.122 (33,8%) и реже встречающимися сублиниями, затем произошла их диссоциация, и до 80% в общей структуре стала занимать сублиния AY.122 (**рис. 5**).

Вариант Omicron начал стремительное распространение с декабря 2021 г., и в настоящее время он полностью доминирует на территории России (100% всех исследованных образцов). Анализ данных национальной базы VGARus позволил выявить диссоциацию генетической линии Omicron на территории России с наибольшей частотой циркуляции субвариантов BA.1 (54,5%), BA.1.1 (21,6%) и BA.2 (23,8%). Субвариант BA.3 не получил столь значимого распространения и на сегодняшний день составляет менее 0,1% в общей структуре популяции Omicron (**рис. 6**).

Следует отметить, что в структуре линии Omicron (B.1.1.529+BA.*) с 01.03.2022 начал преобладать субвариант BA.2, что совпало со снижением уровня заболеваемости COVID-19. В общей структуре на сегодняшний день он занимает свыше 80% (**рис. 7**).

Таким образом, проанализировав структуру доминирующих геновариантов линии Delta (B.1.617.2+AY.*) и линии Omicron (B.1.1.529+BA.*), можно отметить, что неоднородность и быстрая смена патогенных свойств и контагиозности ви-

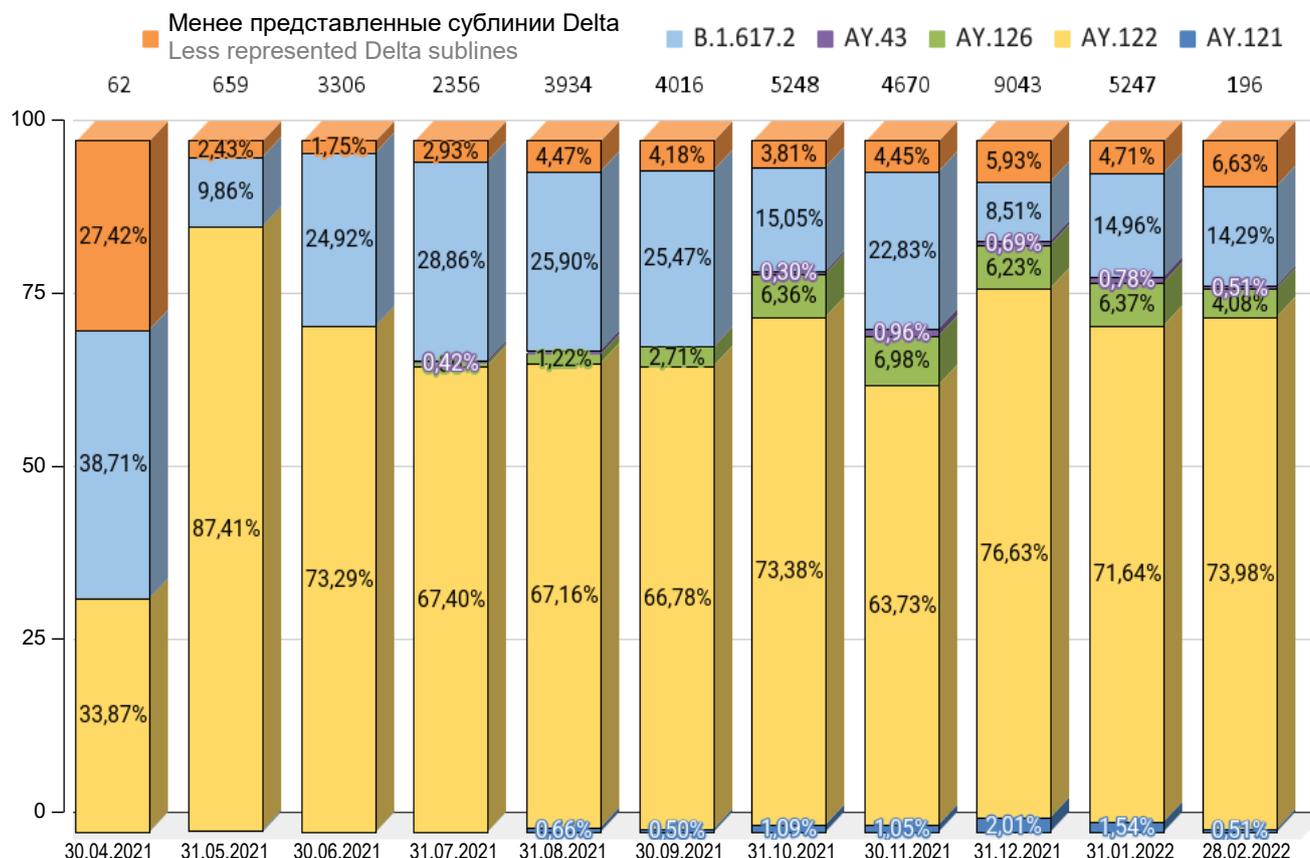


Рис. 5. Динамика субвариантов линии Delta (B.1.617.2+AY.*), выделенных в России, по данным национальной базы VGARus.

Fig. 5. Dynamics of subvariants of the Delta lineage (B.1.617.2+AY.*), which were isolated in Russia, based on the data from the national VGARus database.

руса однозначно влияют на течение эпидемического процесса. Доказательством этому утверждению служат показатели динамики проявлений эпидемического процесса и тяжести течения заболевания (табл. 2). Максимальный уровень заболеваемости в 2020 г. (преобладание Уханьского штамма) составил 51,31 (на 100 тыс. населения); максимальный уровень заболеваемости в 2021 г. (преобладание штамма Delta) — 192,45 (на 100 тыс. населения); максимальный уровень заболеваемости в 2022 г. (преобладание штамма Omicron) — 905,37 (на 100 тыс. населения).

Обсуждение

В первый год присутствия SARS-CoV-2 в человеческой популяции в его геноме не наблюдалось нуклеотидных замен, которые бы привели к заметным изменениям свойств патогена. Однако, поскольку сохранение возбудителя как биологического вида невозможно без эволюционного развития, начинается расширение диапазона гетерогенности популяции коронавируса за счёт циркуляции как маловирулентных, так и вирулентных вариантов с последующим стабилизирующим отбором и становлением эпидемического варианта возбу-

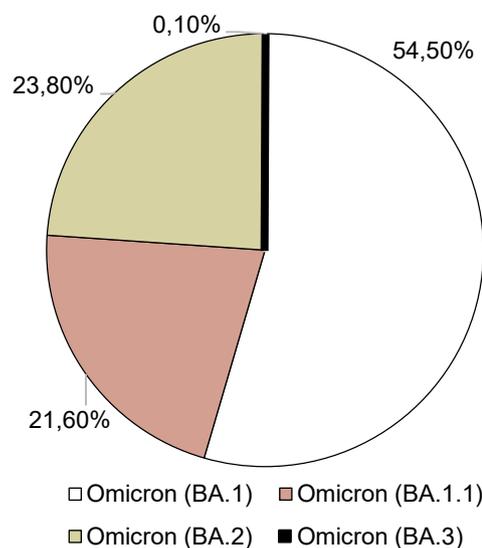


Рис. 6. Структура субвариантов линии Omicron (B.1.1.529+BA.*), выделенных в России, по данным национальной базы VGARus на 26.06.2022.

Fig. 6. Subvariants of the Omicron lineage (B.1.1.529+BA.*), which were isolated in Russia, based on the data from the national VGARus database as of 26/6/2022.

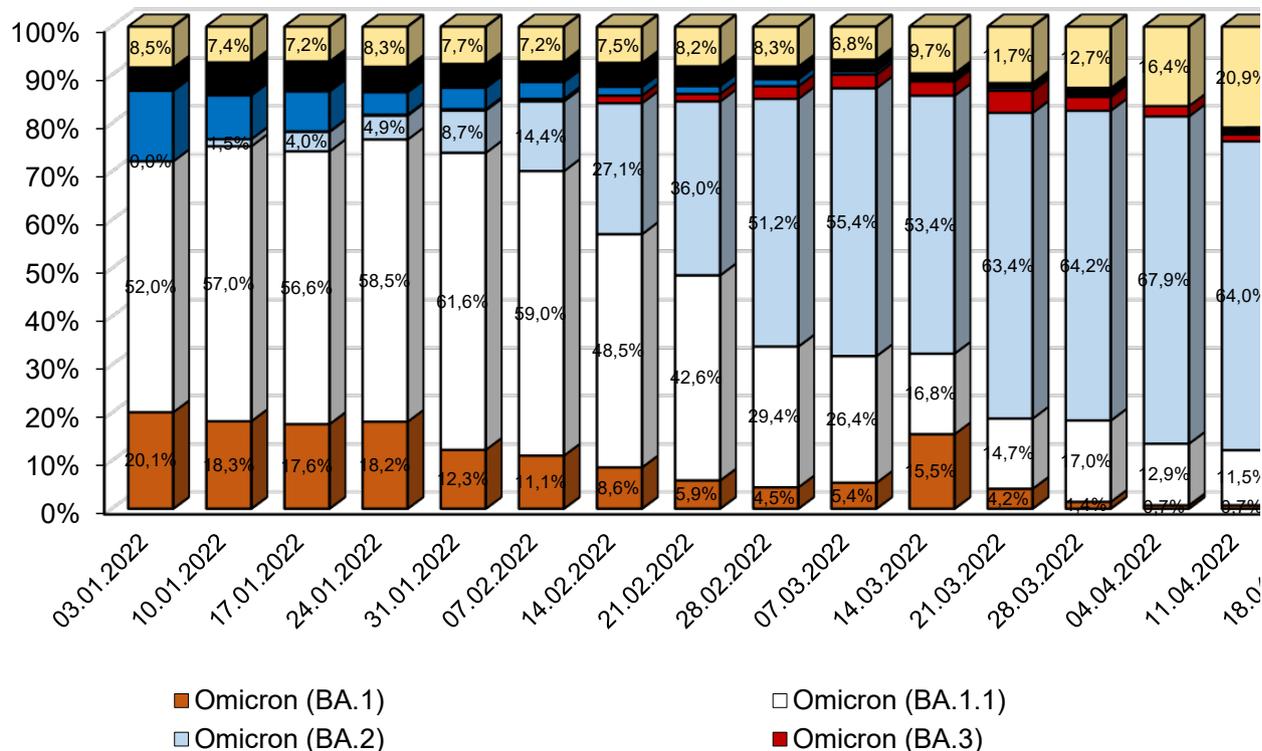


Рис. 7. Динамика субвариантов линии Omicron (B.1.1.529+BA.*), выделенных в России, по данным национальной базы VGARus.

Fig. 7. Dynamics of subvariants of the Omicron lineage (B.1.1.529 + BA.*), which were isolated in Russia, based on the data from the national VGARus database.

Таблица 2. Сравнительная характеристика (динамика) проявлений эпидемического процесса COVID-19 с учётом эволюции возбудителя

Table 2. Comparative analysis (dynamics) of the manifestations of the COVID-19 epidemic process, considering the evolution of the pathogen

Проявления эпидемического процесса Manifestations of the epidemic process	Уханьский геновариант Wuhan genetic variant	Геновариант Delta Delta genetic variant	Геновариант Omicron Omicron genetic variant
Заболееваемость на 100 тыс. населения Incidence per 100,000 population	51,31	192,45	905,37 (рост в 17,6 раза; $p < 0,05$) 905.37 (a 17.6-fold increase; $p < 0.05$)
Удельный вес тяжёлых форм инфекции, % Percentage of severe cases of infection, %	4,5	2,6	0,4% (снижение в 11,3 раза; $p < 0,05$) 0.4% (a 11.3-fold decrease; $p < 0.05$)
Удельный вес циркуляции коронавируса среди условно здорового населения, %* Percentage of circulating coronaviruses among relatively healthy population, %*	10–12	13–16	30–37% (рост в 3 раза; $p < 0,05$) 30–37% (a 3-fold increase; $p < 0.05$)
Удельный вес детей среди заболевших, % Percentage of children among affected individuals, %	10	12	18% (рост в 1,8 раза; $p < 0,05$) 18% (a 1.8-fold increase; $p < 0.05$)

Примечание. *По данным города Москвы и Московской области ($n = 2\,366\,527$).

Note. *Based on the data for Moscow and Moscow Region ($n = 2,366,527$).

теля. Первые значимые VOCs выявлены в конце 2020 г. — начале 2021 г.: Alpha (B.1.1.7) в Великобритании, Beta (B.1.351) в Южной Африке, Gamma (P.1) в Бразилии и Delta (B.1.617.2) в Индии⁴. Возникшие мутации изменили аминокислотную последовательность

связывания рецептора ACE2 определяет проникновение вируса в чувствительные клетки человеческого организма и является основным фактором патогенеза COVID-19. Подобные мутации вызывают обоснованные опасения, поскольку от них зависит, станет ли вирус более агрессивным.

В ноябре 2021 г. конец осторожному оптимизму экспертов и надеждам на скорое окончание пандемии.

⁴ WHO. Weekly epidemiological update on COVID-19 — 22 March 2022. URL: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---22-march-2022>

демии COVID-19 положило появление нового варианта коронавируса SARS-CoV-2, впервые идентифицированного в Ботсване и Южно-Африканской Республике. Новая линия получила обозначение BA.2, основная линия недавно выявленного варианта коронавируса — BA.1, общее название варианта осталось неизменным — B.1.1.529 по классификации PANGO. 26.11.2021 ВОЗ классифицировала мутировавший вирус как VOC и присвоила ему код Omicron (B.1.1.529+BA.*). По мнению специалистов, SARS-CoV-2 эволюционировал и геномные изменения привели к появлению таких характеристик, как способность вызывать интенсивную передачу вируса, изменять клиническую симптоматику заболевания, уклоняться от иммунного ответа, средств диагностики или лекарственных препаратов. Появление множества кластеров COVID-19 на разных континентах может оказать влияние на эпидемиологическую обстановку, привести к возникновению нового источника риска для здоровья населения во всём мире и появлению новой волны заражений. В этой связи всем странам рекомендуется усилить эпидемиологический надзор; активно проводить геномное секвенирование для эффективного отслеживания циркулирующих вариантов SARS-CoV-2; депонировать полные последовательности генома вируса и сопутствующих метаданных в общедоступную базу данных, например GISAID. В связи с глобальным доминированием геноварианта Omicron необходимо изучать его воздействие на тяжесть заболевания, эффективность противоэпидемических мер, иммунный ответ, нейтрализующую активность антител и другие представляющие интерес параметры⁵.

К настоящему времени накопился значительный массив данных об эволюционных изменениях генома SARS-CoV-2 с учётом тенденций приобретения новых эпидемиологических свойств. За период циркуляции в человеческой популяции геном SARS-CoV-2, приспособившись к новому хозяину, приобрёл определённое количество нуклеотидных замен.

Пандемия COVID-19 в очередной раз подтвердила правильность теории академика В.Д. Белякова, согласно которой основу развития эпидемического процесса составляет фазовое изменение гетерогенности биологических свойств взаимодействующих популяций возбудителя и человека, основанной на обратных отрицательных связях в процессе саморегуляции, при этом важное значение имеют социальные и природные факторы [14, 15]. В соответствии с теорией саморегуляции паразитарных систем изменения связаны не только с генетической вари-

бельностью, но и с другими полидетерминантными характеристиками возбудителя: при появлении новых геновариантов SARS-CoV-2 стал менее патогенным для человека, но более контагиозным. Это обстоятельство является важным не только для теоретической, но и для практической эпидемиологии, т.к. даёт возможность прогнозировать направления развития эпидемической ситуации.

Заключение

Полногеномное секвенирование геновариантов SARS-CoV-2 на территории России с 28.12.2020 по 26.06.2022, проведённое на основе базы данных платформы VGARus, выявило превалирование геновариантов Delta и Omicron и позволило установить, что генетический вариант Delta (B.1.617.2 + AY.*) с мая по декабрь 2021 г. являлся доминирующим на территории страны с преобладанием субварианта AY.122 (83,3%). Вариант Omicron начал стремительное распространение с декабря 2021 г. с диссоциацией генетической линии Omicron и преобладанием субвариантов BA.1, BA.1.1 и BA.2. Сублиния BA.3 не получила столь значимого распространения и на сегодняшний день занимает долю менее 0,1% в общей структуре популяции Omicron. Доля сублинии BA.2 постепенно возрастает (до 80% в структуре сублиний Omicron, выделяемых на 16–17-й неделе 2022 г.). В России зарегистрированы единичные геноварианты BA.4 и BA.5, которые не получили эпидемического распространения, а клинические проявления проходят в бессимптомной форме или имеют лёгкое течение заболевания в форме острой респираторной вирусной инфекции.

Установлено, что при появлении новых геновариантов вирус SARS-CoV-2 стал менее патогенным для человека, но более контагиозным. Доказательством этого утверждения служат показатели динамики проявлений эпидемического процесса и тяжести течения заболевания.

Вирус SARS-CoV-2 находится в процессе эволюционного развития, что требует непрерывных научных исследований с использованием передовых методов полногеномного анализа его генетических последовательностей.

Таким образом, в настоящее время молекулярно-генетический мониторинг циркуляции возбудителя SARS-CoV-2 является ведущим направлением эпидемиологического надзора за COVID-19, позволяющим принимать решения по разработке и осуществлению противоэпидемических мероприятий.

Коллектив авторов выражает благодарность организациям, участвовавшим в секвенировании:

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

⁵ WHO. Classification of Omicron (B.1.1.529): SARS-CoV-2 Variant of Concern; 2021. URL: [https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-\(b.1.1.529\)-sars-cov-2-variant-of-concern](https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-(b.1.1.529)-sars-cov-2-variant-of-concern)

- Российский национальный исследовательский медицинский институт им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия;
- Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
- Научный медицинский исследовательский центр гематологии, Москва, Россия;
- Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск, Россия;
- Научный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова, Москва, Россия;
- Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии, Тюмень, Россия;
- Центр гигиены и эпидемиологии, Пермь, Россия;
- Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии, пос. Вольгинский, Россия;
- Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова, Москва, Россия;
- Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью, Москва, Россия.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Акимкин В.Г., Кузин С.Н., Семенов Т.А., Плоскирева А.А., Дубоделов Д.В., Тиванова Е.В. и др. Характеристика эпидемиологической ситуации по COVID-19 в Российской Федерации в 2020 г. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2021; 76(4): 412–22. <https://doi.org/10.15690/vramn1505>
2. Пшеничная Н.Ю., Лизинфельд И.А., Журавлев Г.Ю., Плоскирева А.А., Акимкин В.Г. Эпидемический процесс COVID-19 в Российской Федерации: промежуточные итоги. Сообщение 1. *Инфекционные болезни*. 2020; 18(3): 7–14. <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2020-3-7-14>
3. Пшеничная Н.Ю., Лизинфельд И.А., Журавлев Г.Ю., Плоскирева А.А., Еровиченков А.А., Акимкин В.Г. Эпидемический процесс COVID-19 в Российской Федерации: промежуточные итоги. Сообщение 2. *Инфекционные болезни*. 2021; 19(1): 10–5. <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2021-1-10-15>
4. Кутырев В.В., Попова А.Ю., Смоленский В.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Сафронов В.А. и др. Эпидемиологические особенности новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Сообщение 1: Модели реализации профилактических и противоэпидемических мероприятий. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; (1): 6–13. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-1-6-13>
5. Краснов Я.М., Попова А.Ю., Сафронов В.А., Федоров А.В., Баданин Д.В., Щербакова С.А. и др. Анализ геномного разнообразия SARS-CoV-2 и эпидемиологических признаков адаптации возбудителя COVID-19 к человеческой популяции (Сообщение 1). *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; (3): 70–82. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-3-70-82>
6. Акимкин В.Г., Кузин С.Н., Семенов Т.А., Шипулина О.Ю., Яцышина С.Б., Тиванова Е.В. и др. Закономерности эпидемического распространения SARS-CoV-2 в условиях мегаполиса. *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(4): 203–11. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-203-211>

7. Акимкин В.Г., Кузин С.Н., Семенов Т.А., Плоскирева А.А., Дубоделов Д.В., Тиванова Е.В. и др. Гендерно-возрастная характеристика пациентов с COVID-19 на разных этапах эпидемии в Москве. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; (3): 27–35. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-3-27-35>
8. Щелканов М.Ю., Попова А.Ю., Дедков В.Г., Акимкин В.Г., Малеев В.В. История изучения и современная классификация коронавирусов (Nidovirales: Coronaviridae). *Инфекция и иммунитет*. 2020; 10(2): 221–46. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-HOI-1412>
9. Kapteleva V.V., Bukharina A.Y., Shipulina O.Y., Korneenko E.V., Saenko S.S., Lukyanov A.V., et al. Case report: change of dominant strain during dual SARS-CoV-2 infection. *BMC Infect. Dis.* 2021; 21(1): 959. <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06664-w>
10. Борисова Н.И., Котов И.А., Колесников А.А., Каптелова В.В., Сперанская А.С., Кондрашева Л.Ю. и др. Мониторинг распространения вариантов SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus; Sarbecovirus*) на территории Московского региона с помощью таргетного высокопроизводительного секвенирования. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(4): 269–78. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-72>
11. Дубоделов Д.В., Савельев Е.В., Плоскирева А.А., Акимкин В.Г., Глазов М.Б., Гасанов Г.А. и др. Централизованная база данных для построения эпидемиологической аналитики по новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Патент РФ № 2021622334; 2021.
12. Дубоделов Д.В., Савельев Е.В., Плоскирева А.А., Акимкин В.Г., Глазов М.Б., Гасанов Г.А. и др. Эпидемиологическая аналитика по новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Патент РФ № 2021667476; 2021.
13. Попова А.Ю., ред. *COVID-19: научно-практические аспекты борьбы с пандемией в Российской Федерации*. Саратов: Амрит; 2021.
14. Беляков В.Д. Внутренняя регуляция эпидемического процесса (ответы на замечания и вопросы, поднятые при обсуждении теории). *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1987; 64(10): 78–89.
15. Беляков В.Д., Голубев Д.Б., Каминский Г.Д., Тец В.В. *Саморегуляция паразитарных систем*. Ленинград: Медицина; 1987.

REFERENCES

1. Akimkin V.G., Kuzin S.N., Semenenko T.A., Ploskireva A.A., Dubodelov D.V., Tivanova E.V. Characteristics of the COVID-19 epidemiological situation in the Russian Federation in 2020. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2021; 76(4): 412–22. <https://doi.org/10.15690/vramn1505> (in Russian)
2. Pshenichnaya N.Yu., Lizinfel'd I.A., Zhuravlev G.Yu., Ploskireva A.A., Akimkin V.G. The epidemic process of COVID-19 in the Russian Federation: interim results. 1st report. *Infektsionnye bolezni*. 2020; 18(3): 7–14. <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2020-3-7-14> (in Russian)
3. Pshenichnaya N.Yu., Lizinfel'd I.A., Zhuravlev G.Yu., Ploskireva A.A., Erovichenkov A.A., Akimkin V.G. Epidemic process of COVID-19 in the Russian Federation: interim results. 2nd report. *Infektsionnye bolezni*. 2021; 19(1): 10–5. <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2021-1-10-15> (in Russian)
4. Kutyrev V.V., Popova A.Yu., Smolenskiy V.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Safronov V.A., et al. Epidemiological features of new coronavirus infection (COVID-19). Communication 1: Models of implementation of preventive and anti-epidemic measures. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2020; (1): 6–13. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-1-6-13> (in Russian)

5. Krasnov Ya.M., Popova A.Yu., Safronov V.A., Fedorov A.V., Badanin D.V., Shcherbakova S.A., et al. Genomic diversity analysis of SARS-CoV-2 and epidemiological features of adaptation of COVID-19 agent to human population (Communication 1). *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2020; (3): 70–82. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-3-70-82> (in Russian)
6. Akimkin V.G., Kuzin S.N., Semenenko T.A., Shipulina O.Yu., Yatsyshina S.B., Tivanova E.V., et al. Patterns of the SARS-CoV-2 epidemic spread in a megacity. *Voprosy virusologii*. 2020; 65(4): 203–11. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-203-211> (in Russian)
7. Akimkin V.G., Kuzin S.N., Semenenko T.A., Ploskireva A.A., Dubodelov D.V., Tivanova E.V., et al. Gender-age distribution of patients with COVID-19 at different stages of epidemic in Moscow. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2020; (3): 27–35. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-3-27-35> (in Russian)
8. Shchelkanov M.Yu., Popova A.Yu., Dedkov V.G., Akimkin V.G., Maleev V.V. History of investigation and current classification of coronaviruses (Nidovirales: Coronaviridae). *Infektsiya i immunitet*. 2020; 10(2): 221–46. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-HOI-1412> (in Russian)
9. Kapteleva V.V., Bukharina A.Y., Shipulina O.Y., Korneenko E.V., Saenko S.S., Lukyanov A.V., et al. Case report: change of dominant strain during dual SARS-CoV-2 infection. *BMC Infect. Dis.* 2021; 21(1): 959. <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06664-w>
10. Borisova N.I., Kotov I.A., Kolesnikov A.A., Kapteleva V.V., Speranskaya A.S., Kondrasheva L.Yu., et al. Monitoring the spread of the SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus; Sarbecovirus*) variants in the Moscow region using targeted high-throughput sequencing. *Voprosy virusologii*. 2021; 66(4): 269–78. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-72> (in Russian)
11. Dubodelov D.V., Savel'er E.V., Ploskireva A.A., Akimkin V.G., Glazov M.B., Gasanov G.A., et al. Centralized database for building epidemiological analytics on the novel coronavirus infection (COVID-19). Patent RF № 2021622334; 2021. (in Russian)
12. Dubodelov D.V., Savel'er E.V., Ploskireva A.A., Akimkin V.G., Glazov M.B., Gasanov G.A., et al. Epidemiological analytics on the novel coronavirus infection (COVID-19). Patent RF No 2021667476; 2021. (in Russian)
13. Popova A.Yu., ed. *COVID-19: Scientific and Practical Aspects of the Fight Against the Pandemic in the Russian Federation [COVID-19: nauchno-prakticheskie aspekty bor'by s pandemiei v Rossiyskoy Federatsii]*. Saratov: Amirit; 2021. (in Russian)
14. Belyakov V.D. Internal regulation of the epidemic process (answers to comments and questions raised during the discussion of the theory). *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 1987; 64(10): 78–89. (in Russian)
15. Belyakov V.D., Golubev D.B., Kaminskiy G.D., Tets V.V. *Self-Regulation of Parasitic Systems [Samoregulyatsiya parazitarnykh sistem]*. Leningrad: Meditsina; 1987. (in Russian)

Информация об авторах

Акимкин Василий Геннадьевич — д.м.н., профессор, академик РАН, директор ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>

Попова Анна Юрьевна — д.м.н., профессор, Главный государственный санитарный врач Российской Федерации, рук. Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4315-5307>

Хафизов Камиль Фаридович — PhD, зав. лаб. геномных исследований ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5524-0296>

Дубоделов Дмитрий Васильевич — к.м.н., с.н.с. лаб. вирусных гепатитов отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3093-5731>

Углева Светлана Викторовна[✉] — д.м.н., доцент, консультант организационно-методического отдела административно-управленческого подразделения ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, uglevas@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1322-0155>

Семенов Татьяна Анатольевна — д.м.н., профессор, рук. отдела эпидемиологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6686-9011>

Плоскирева Антонина Александровна — д.м.н., зам. директора ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3612-1889>

Горелов Александр Васильевич — д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9257-0178>

Пшеничная Наталья Юрьевна — д.м.н., зам. директора ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2570-711X>

Ежлова Елена Борисовна — к.м.н., зам. рук. Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8701-280X>

Information about the authors

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

Anna Yu. Popova — D. Sci. (Med.), Professor, Head, Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4315-5307>

Kamil F. Khafizov — PhD, Head, Genomic research laboratory, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <http://orcid.org/0000-0001-5524-0296>

Dmitry V. Dubodelov — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of viral hepatitis, Department of molecular diagnostics and epidemiology, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3093-5731>

Svetlana V. Ugleva[✉] — D. Sci. (Med.), Assoc. Prof., consultant, Organizational and methodological department, Administrative division, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, uglevas@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1322-0155>

Tatyana A. Semenenko — D. Sci. (Med.), Professor, Head, Department of epidemiology, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gama-leya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6686-9011>

Antonina A. Ploskireva — D. Sci. (Med.), Deputy director, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3612-1889>

Alexander V. Gorelov — D. Sci. (Med.), Professor, RAS Corresponding Member, Deputy Director for Science, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9257-0178>

Natalia Yu. Pshenichnaya — D. Sci. (Med.), Deputy director, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2570-711X>

Elena B. Yezhlova — Cand. Sci. (Med.), Deputy Head, Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8701-280X>

Летюшев Александр Николаевич — к.м.н., начальник Управления научно-аналитического обеспечения и международной деятельности Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4185-9829>

Демина Юлия Викторовна — д.м.н., начальник Управления эпидемиологического надзора Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0538-1992>

Кутырев Владимир Викторович — д.м.н., профессор, академик РАН, директор Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3788-3452>

Максютов Ринат Амирович — д.б.н., директор ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1314-281X>

Говорун Вадим Маркович — д.б.н., профессор, академик РАН, директор НИИ системной биологии и медицины, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0837-8764>

Дятлов Иван Алексеевич — д.м.н., профессор, академик РАН, директор ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболensk, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3436-0368>

Тотолян Арег Артемович — д.м.н., профессор, академик РАН, зав. лаб. молекулярной иммунологии, директор НИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4571-8799>

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

Балахонов Сергей Владимирович — д.м.н., профессор, директор Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока, Иркутск, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4201-5828>

Рудаков Николай Викторович — д.м.н., профессор, директор Омского НИИ природно-очаговых инфекций, Омск, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9566-9214>

Троценко Ольга Евгеньевна — д.м.н., профессор, директор Хабаровского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии, Хабаровск, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3050-4472>

Носков Алексей Кимович — к.м.н., директор Ростовского-на-Дону противочумного института, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0550-2221>

Зайцева Наталья Николаевна — д.м.н., директор Нижегородского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5370-4026>

Топорков Андрей Владимирович — д.м.н., доцент, директор Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3449-4657>

Люзнов Дмитрий Анатольевич — д.м.н., директор НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3643-7354>

Андреева Елена Евгеньевна — д.м.н., профессор, рук. Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по городу Москве, главный государственный санитарный врач по городу Москве, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6687-7276>

Микаилова Ольга Михайловна — к.м.н., Главный государственный санитарный врач по Московской области, рук. Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Московской области, Мытищи, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3842-6368>

Комаров Андрей Григорьевич — директор Диагностического центра (Центра лабораторных исследований) ДЗМ, Москва, Россия

Ананьев Василий Юрьевич — к.м.н., главный врач Федерального центра гигиены и эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1670-6791>

Alexander N. Letyushev — Cand. Sci. (Med.), Head, Department of scientific and analytical support and international activities, Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4185-9829>

Yulia V. Demina — D. Sci. (Med.), Head, Department of epidemiological surveillance, Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0538-1992>

Vladimir V. Kutyrev — D. Sci. (Med.), Professor, RAS Full Member, Director, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3788-3452>

Rinat A. Maksyutov — D. Sci. (Biol.), Director, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1314-281X>

Vadim M. Govorun — D. Sci. (Biol.), Professor, RAS Full Member, Director, Scientific Research Institute of System Biology and Medicine, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0837-8764>

Ivan A. Dyatlov — D. Sci. (Med.), Professor, RAS Full Member, Director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3436-0368>

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

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

Sergey V. Balakhonov — Director, Irkutsk Anti-Plague Institute Research of Siberia and Far East, Irkutsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4201-5828>

Nikolay V. Rudakov — D. Sci. (Med.), Professor, Director, Omsk Research Institute of Natural Focal Infections, Omsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9566-9214>

Olga E. Trotsenko — D. Sci. (Med.), Director, Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3050-4472>

Alexey K. Noskov — Cand. Sci. (Med.), Director, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0550-2221>

Natalia N. Zaitseva — D. Sci. (Med.), Director, Blokhina Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5370-4026>

Andrey V. Toporkov — D. Sci. (Med.), Associate Professor, Director, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russia, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3449-4657>

Dmitry A. Lioznov — D. Sci. (Med.), Director, Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3643-7354>

Elena E. Andreeva — Head, Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare in the City of Moscow, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6687-7276>

Olga M. Mikailova — Cand. Sci. (Med.), Chief State Sanitary Doctor in the Moscow Region, Head, Office of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Well-Being in Moscow Region, Mytishchi, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3842-6368>

Andrey G. Komarov — Director, Diagnostic Center (Center for Laboratory Research) of the Moscow City Health Department, Moscow, Russia

Vasily Yu. Ananyev — Cand. Sci. (Med.), Chief physician, Federal Center for Hygiene and Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1670-6791>

Vladimir V. Moldovanov — D. Sci. (Med.), chief physician, Federal Center for Hygiene and Epidemiology in Moscow, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5606-4906>

Молдованов Владимир Валерьевич — д.м.н., главный врач Центра гигиены и эпидемиологии в городе Москве, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5606-4906>

Логонов Денис Юрьевич — д.б.н., член-корр. РАН, зам. директора по научной работе НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4035-6581>

Гущин Владимир Алексеевич — к.б.н., зав. лаб. механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9397-3762>

Дедков Владимир Георгиевич — к.м.н., зам. директора по научной работе НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5500-0169>

Черкашина Анна Сергеевна — к.х.н., рук. научной группы геномной инженерии и биотехнологии отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7970-7495>

Кузин Станислав Николаевич — д.м.н., профессор, зав. лаб. вирусных гепатитов отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0616-9777>

Тиванова Елена Валерьевна — рук. направления лабораторной медицины и продвижения лабораторных услуг отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1286-2612>

Кондрашева Лариса Юрьевна — зав. лаб. полимеразной цепной реакции ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0147-4262>

Саенко Валерия Владимировна — руководитель научной группы геномных технологий ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0952-0830>

Селезов Семен Юрьевич — биоинформатик, лаборатория геномных исследований ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9451-4341>

Гасанов Гасан Алиевич — аспирант ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0121-521X>

Сванадзе Нино Хвичиевна — врач-эпидемиолог лаб. вирусных гепатитов отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7524-3080>

Глазов Максим Борисович — рук. центра по развитию информационных технологий и систем ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2195-1580>

Остроушко Алексей Александрович — рук. Информационно-аналитической службы ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0803-5630>

Миронов Константин Олегович — д.м.н., рук. лаб. молекулярных методов изучения генетических полиморфизмов ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8207-9215>

Есьман Анна Сергеевна — н.с. лаб. молекулярных методов изучения генетических полиморфизмов ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5456-7649>

Осина Наталья Александровна — к.б.н., зав. лаб. молекулярной диагностики Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0954-5683>

Боднев Сергей Александрович — к.м.н., в.н.с. ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0599-3817>

Комиссаров Андрей Борисович — зав. лаб. молекулярной вирусологии НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1733-1255>

Даниленко Дарья Михайловна — к.б.н., зам. директора по научной работе НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6174-0836>

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

Denis Yu. Logunov — D. Sci. (Biol.), Corresponding Member of RAS, Deputy Director for research, N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4035-6581>

Vladimir A. Gushchin — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of mechanisms of population variability of pathogenic diseases, N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9397-3762>

Vladimir G. Dedkov — Cand. Sci. (Med.), Deputy Director for science, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5500-0169>

Anna S. Cherkashina — Cand. Sci. (Chem.), Head, Scientific group of genetic engineering and biotechnology, Department of molecular diagnostics and epidemiology, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7970-7495>

Stanislav N. Kuzin — D. Sci. (Med.), Professor, Laboratory of viral hepatitis, Department of molecular diagnostics and epidemiology, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0616-9777>

Elena V. Tivanova — Head, Directions of laboratory medicine and promotion of laboratory services, Department of molecular diagnostics and epidemiology, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1286-2612>

Larisa Yu. Kondrasheva — Head, Laboratory of polymerase chain reaction, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0147-4262>

Valeria V. Saenko — Head, Scientific group of genomic technologies, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0952-0830>

Semyon Yu. Selezov — bioinformatician, Laboratory of genomic research, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia <https://orcid.org/0000-0001-9451-4341>

Gasan A. Gasanov — post-graduate student, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0121-521X>

Nino Kh. Svanadze — epidemiologist, Laboratory of viral hepatitis, Department of molecular diagnostics and epidemiology, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7524-3080>

Maxim B. Glazov — Head, Center for the development of information technologies and systems, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2195-1580>

Aleksey A. Ostroushko — Head, Information and analytical service, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0803-5630>

Konstantin O. Mironov — D. Sci. (Med.), Head, Laboratory of molecular methods for genetic polymorphisms detection, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8207-9215>

Anna S. Esman — researcher, Laboratory of Molecular methods for genetic polymorphisms research, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5456-7649>

Natalia A. Osina — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of molecular diagnostics, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0954-5683>

Sergei A. Bodnev — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector": Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0599-3817>

Andrey B. Komissarov — Head, Laboratory of Molecular Virology, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1733-1255>

Daria M. Danilenko — Cand. Sci. (Biol.), Deputy Director for Science, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6174-0836>

Aleksandr G. Bogun — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Department of Collection Cultures, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russia <https://orcid.org/0000-0001-5454-2495>

Скрябин Юрий Павлович — к.б.н., н.с. лаб. антимикробных препаратов ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболensk, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5748-995X>

Лопатовская Кристина Викторовна — н.с. лаб. природно-очаговых вирусных инфекций Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока, Иркутск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8772-5842>

Штрек Сергей Владимирович — к.м.н., с.н.с. лаб. зоонозных инфекций Омского НИИ природно-очаговых инфекций, Омск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4509-1212>

Волынкина Анна Сергеевна — к.б.н., зав. лаб. диагностики вирусных инфекций Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5554-5882>

Гладких Анна Сергеевна — к.б.н., с.н.с. группы молекулярной генетики патогенных микроорганизмов отдела эпидемиологии Санкт-Петербургского НИИЭИМ им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6759-1907>

Котова Валерия Олеговна — с.н.с., зав. лаб. эпидемиологии и профилактики вирусных гепатитов и СПИДа Хабаровского НИИЭИМ, Хабаровск, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9824-7025>

Водопьянов Алексей Сергеевич — к.м.н., и.о. зав. группой вирусологии Ростовского-на-Дону противочумного института, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>

Новикова Надежда Алексеевна — д.б.н., профессор, зав. лаб. молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций Нижегородского НИИЭИМ им. акад. И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3710-6648>

Сперанская Анна Сергеевна — к.б.н., с.н.с. Центра геномики и масс-спектрометрии НИИ системной биологии и медицины, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6326-1249>

Самойлов Андрей Евгеньевич — к.б.н., с.н.с. Центра геномики и масс-спектрометрии НИИ системной биологии и медицины, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8284-3164>

Неверов Алексей Дмитриевич — к.б.н., рук. группы биоинформатики ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3594-1682>

Шпак Иван Михайлович — к.м.н., н.с. сектора биоинформационного анализа Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6446-0274>

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

Статья поступила в редакцию 09.06.2022;
принята к публикации 01.08.2022;
опубликована 30.08.2022

Yuriy P. Skryabin — Cand. Sci. (Biol.), research scientist, Laboratory of antimicrobial agents, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow region, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5748-995X>

Kristina V. Lopatovskaya — researcher, Laboratory of natural focal viral infections, Irkutsk Anti-plague Research Institute of Siberia and Far East of the Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Irkutsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8772-5842>

Sergey V. Shtrek — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of Zoonotic Infections, Omsk Research Institute of Natural Focal Infections, Omsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4509-1212>

Anna S. Volynkina — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory for Diagnostics of Viral Infections, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0001-5554-5882>

Anna S. Gladkikh — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Group of Molecular Genetics of Pathogenic Microorganisms, Department of Epidemiology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6759-1907>

Valeria O. Kotova — senior researcher, Head, Laboratory of Epidemiology and Prevention of Viral Hepatitis and AIDS, Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9824-7025>

Alexey S. Vodopyanov — Cand. Sci. (Med.), Deputy head, Group of virology, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>

Nadezhda A. Novikova — D. Sci. (Biol.), Professor, Head, Laboratory of Molecular Epidemiology of Viral Infections, Blokhina Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3710-6648>

Anna S. Speranskaya — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Center for Genomics and Mass Spectrometry, Scientific Research Institute of System Biology and Medicine, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6326-1249>

Andrey E. Samojlov — Ph.D. (Biology), Senior Researcher Center for Genomics and Mass Spectrometry, Scientific Research Institute of System Biology and Medicine, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8284-3164>

Alexey D. Neverov — Cand. Sci. (Biol.), Head, Group of bioinformatics, Central Research Institute of Epidemiology, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3594-1682>

Ivan M. Shpak — Ph.D. (Med.), researcher, Sector of bioinformatics analysis, Volgograd Research Institute for Plague Control, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6446-0274>

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

The article was submitted 19.06.2022;
accepted for publication 01.08.2022;
published 30.08.2022



Биологическая характеристика холодоадаптированных вариантов коронавируса SARS-CoV-2

Файзулов Е.Б.¹, Корчевая Е.Р.¹, Грачева А.В.¹, Самойликов Р.В.¹, Смирнова Д.И.¹, Соколова О.С.², Глухов Г.С.², Моисеенко А.В.², Ленева И.А.¹, Нагиева Ф.Г.¹, Свитич О.А.^{1,3}, Зверев В.В.^{1,3}

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

²Московский государственный университет имени Ломоносова, Россия;

³Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Россия

Аннотация

Введение. В связи с появлением новых эпидемиологически значимых вариантов SARS-CoV-2 актуальной является разработка живой вакцины, способной обеспечить защиту против широкого спектра антигенных вариантов вируса. **Целью** исследования являлись получение и биологическая характеристика аттенуированных путём холодовой адаптации вариантов SARS-CoV-2.

Материалы и методы. Лабораторный штамм SARS-CoV-2 Dubrovka и его варианты культивировали в клетках Vero и Calu-3. Количественное определение вируса проводили путём титрования в клетках Vero и методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени. Вирионы SARS-CoV-2 характеризовали методом трансмиссионной электронной микроскопии. Геномные последовательности вируса определяли методом нанопорового секвенирования. Аттенуационный (*att*) фенотип вариантов SARS-CoV-2 определяли на животной модели COVID-19 на сирийских хомяках.

Результаты. В результате длительного пассирования штамма Dubrovka в культуре клеток Vero при постепенно понижаемой до 23°C температуре и последующего клонирования получены холодоадаптированные (*ca*, *cold-adapted*) варианты SARS-CoV-2 Dubrovka-ca-B4 и Dubrovka-ca-D2. В геномах *ca*-вариантов обнаружено до 20 нуклеотидных и 18 аминокислотных замен. *Ca*-варианты, в отличие от родоначального штамма Dubrovka, эффективно размножались при 23°C, а вариант Dubrovka-ca-D2 имел температурочувствительный (*ts*) фенотип (не размножился при температуре 39°C). *Ca*-варианты вируса плохо размножались при температуре 37°C в культуре клеток лёгких человека Calu-3, что, наряду с *ts*-фенотипом, может быть маркером аттенуации вируса по отношению к человеку. При интраназальном заражении сирийских хомяков *ca*-варианты вируса проявили аттенуационный фенотип — не приводили к снижению аппетита, вялости, сонливости, не замедляли прироста массы тела, значительно медленнее размножались в лёгких и мозге по сравнению с вирулентным штаммом Dubrovka.

Заключение. Полученные в настоящей работе аттенуированные *ca*-варианты SARS-CoV-2 Dubrovka-ca-B4 и Dubrovka-ca-D2 представляют интерес для дальнейшего исследования в качестве кандидатных вакцинных штаммов для создания живой аттенуированной вакцины против COVID-19.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, холодоадаптированный вирус, аттенуированный вирус, вакцинный штамм

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом НИИВС им. И.И. Мечникова (протокол № 2 от 24.05.2021).

Благодарность. Электронную микроскопию выполняли на уникальной научной установке «Трёхмерная электронная микроскопия и спектроскопия» МГУ имени М.В. Ломоносова.

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-60079 и с использованием научного оборудования центра коллективного пользования НИИВС им. И.И. Мечникова при финансовой поддержке проекта Российской Федерацией в лице Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-676 от 28.07.2021). Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

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

Для цитирования: Файзулов Е.Б., Корчевая Е.Р., Грачева А.В., Самойликов Р.В., Смирнова Д.И., Соколова О.С., Глухов Г.С., Моисеенко А.В., Ленева И.А., Нагиева Ф.Г., Свитич О.А., Зверев В.В. Биологическая характеристика холодоадаптированных вариантов коронавируса SARS-CoV-2. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(4):397–409. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-280>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-280>

Biological characterization of cold-adapted SARS-CoV-2 variants

Evgeny B. Faizuloev¹✉, Ekaterina R. Korchevaya¹, Anastasiia V. Gracheva¹, Roman V. Samoilikov¹, Daria I. Smirnova¹, Olga S. Sokolova², Grigory S. Glukhov², Andrey V. Moiseenko², Irina A. Leneva¹, Firaya G. Nagieva¹, Oksana A. Svitich^{1,3}, Vitaly V. Zverev^{1,3}

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

²Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, Russia;

³I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Abstract

Introduction. The emergence of new epidemiologically significant variants of SARS-CoV-2 has shifted emphasis to development of a live vaccine, which would be able to provide protection against a wide range of antigenic variants of the virus. The **aim** of the study was to obtain SARS-CoV-2 variants attenuated through cold adaptation and to provide their biological characterization.

Materials and methods. The Dubrovka laboratory strain of SARS-CoV-2 and its variants were cultured on Vero and Calu-3 cells. The virus quantification was performed by virus titration in Vero cells and by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. SARS-CoV-2 virions were analyzed using transmission electron microscopy. Genome sequences of the virus were identified by nanopore sequencing. The attenuation (*att*) phenotype of SARS-CoV-2 variants was identified using Syrian hamsters as an animal model for COVID-19.

Results. Cold-adapted (*ca*) SARS-CoV-2 variants – Dubrovka-*ca*-B4 and Dubrovka-*ca*-D2 were produced by continued passaging of the Dubrovka strain in the Vero cell culture at the temperature being gradually decreased to 23°C and by subsequent cloning. Up to 20 nucleotide substitutions and 18 amino acid substitutions were detected in genomes of *ca*-variants. *Ca*-variants, as distinct from the parent Dubrovka strain, actively replicated at 23°C, while the Dubrovka-*ca*-D2 variant had a temperature-sensitive (*ts*) phenotype (did not replicate at 39°C). *Ca*-variants of the virus replicated poorly at 37°C in the Calu-3 human lung cell culture, which, along with the *ts*-phenotype, can be a marker of virus attenuation for humans. In the intranasally infected Syrian hamsters, *ca*-variants of the virus demonstrated an attenuation phenotype: they did not cause loss of appetite, fatigue, drowsiness, did not slow down weight gain, replicating much more slowly in the lungs and brain compared to the virulent Dubrovka strain.

Conclusion. The obtained attenuated SARS-CoV-2 *ca*-variants, Dubrovka-*ca*-B4 and Dubrovka-*ca*-D2, should be studied further as candidate vaccine strains for a live attenuated vaccine against COVID-19.

Keywords: SARS-CoV-2, cold-adapted virus, attenuated virus, vaccine strain

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera (Protocol No. 2, May 24, 2021).

Acknowledgements. The electron microscopy was performed using the unique three-dimensional electron microscopy and spectroscopy equipment at the Lomonosov Moscow State University.

Funding source. The study was performed with financial support from the Russian Foundation for Basic Research as part of scientific project No. 20-04-60079. The scientific equipment was provided by the Resource Sharing Center of the Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera; the project was funded by the Ministry of Education and Science of Russia (Agreement No. 075-15-2021-676 of 28/7/2021). This study was not supported by any external sources of funding.

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

For citation: Faizuloev E.B., Korchevaya E.R., Gracheva A.V., Samoilikov R.V., Smirnova D.I., Sokolova O.S., Glukhov G.S., Moiseenko A.V., Leneva I.A., Nagieva F.G., Svitich O.A., Zverev V.V. Biological characterization of cold-adapted SARS-CoV-2 variants. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(4):397–409. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-280>

Введение

Вакцинопрофилактика является наиболее эффективным подходом к снижению заболеваемости и смертности от COVID-19. Для специфической профилактики новой коронавирусной инфекции широко применяются вакцины, основанные на вирусных векторах, самореплицирующихся РНК, рекомби-

нантных и нативных вирусных антигенах [1–5]. Эти платформы позволяют быстро разрабатывать вакцины, способные давать протективный иммунный ответ. Основными недостатками таких вакцин является относительно малая продолжительность иммунного ответа, неполный набор вирусных антигенов, быстрое появление ускользающих от

поствакцинального иммунитета вирусов-мутантов, высокая себестоимость производства. Несмотря на беспрецедентные противоэпидемические мероприятия и широкое применение вакцин против COVID-19, пандемическое распространение коронавируса SARS-CoV-2 продолжается даже в странах с широким охватом вакцинацией¹. Регулярно регистрируется появление новых штаммов SARS-CoV-2, отличающихся повышенной эпидемиологической значимостью [6–8]. Так, с августа по ноябрь 2021 г. вариант вируса Delta B.1.617.2, пришедший на смену вариантам Alpha, Beta и Gamma, в общемировой структуре заболеваемости занимал не менее 95% [9]. Вариант Delta обладает повышенной контагиозностью и хуже нейтрализуется антисыворотками, полученными от реконвалесцентов COVID-19, вызванной другими вариантами вируса [10–12]. В начале ноября 2021 г. начал быстро распространяться по всему миру вариант SARS-CoV-2 Omicron B.1.1.529, который уже к февралю 2022 г. занял доминирующую позицию, составляя более 95% всех охарактеризованных секвенированием штаммов². Вариант Omicron имеет несколько делеций в геноме и более 30 аминокислотных замен в S-белке, которые привели к повышению аффинности связывания вируса с ACE2-рецептором и, как следствие, повышенной контагиозности и способности ускользать от нейтрализующих антител [13–18]. Так, в работе J. Bowen и соавт. [14] выявлена пониженная нейтрализующая активность сывороток крови как переболевших людей, так и привитых различными вакцинами против COVID-19: mRNA-1273 («Moderna»), BNT162b2 («Pfizer/BioNTech»), COVID-19 Vaccine AstraZeneca («AstraZeneca»), «Спутник V» (НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи), Novavax COVID-19 vaccine («Novavax»), BBIP-CorV («Sinopharm»), Ad26.COV2.S («Johnson&Johnson») по отношению к двум линиям Omicron — BA.1 и BA.2. Для варианта Omicron также отмечается снижение нейтрализующей активности сывороток людей, перенёсших инфекцию, вызванную другими вариантами вируса [15]. Нейтрализующая активность сывороток людей, привитых вакциной CoronaVac («Sinovac Biotech Ltd.»), была значительно снижена либо отсутствовала полностью в отношении варианта Omicron [13, 16]. Моноклональные антитела, которые широко используются в терапии COVID-19, менее эффективны в отношении варианта Omicron [17, 18].

Очевидно, что исследования в области создания вакцин, отличающихся высокой протективной активностью в отношении широкого спектра антигенных вариантов SARS-CoV-2, остаются актуаль-

ными. К числу вакцин, способных обеспечить формирование иммунного ответа как к структурным, так и неструктурным вирусным белкам и активацию не только гуморального, но и клеточного звена иммунитета, относятся живые вакцины. В многочисленных исследованиях доказано, что адаптация вирусов к росту при субоптимальной пониженной температуре приводит к появлению температурочувствительного (*ts*) фенотипа (снижение репликации при температуре 37°C или выше), который ассоциирован с аттенуацией вирулентности для нормального хозяина [19]. При этом полученный холодоадаптированный (*ca*, *cold-adapted*) аттенуированный вирус при иммунизации обеспечивает безопасную и эффективную защиту от заражения вирусом дикого типа [19]. В связи с этим целью настоящего исследования являлись получение и биологическая характеристика *ca*-вариантов коронавируса SARS-CoV-2.

Материалы и методы

Вирус и культура клеток. В работе использован лабораторный штамм SARS-CoV-2 Dubrovka (номер GenBank: MW514307.1) [20] и его варианты: Dubrovka-37, Dubrovka-ca, Dubrovka-ca-B4, Dubrovka-ca-D2 (номера GenBank: ON380441.1, ON040960.1, ON059701.1 и ON040961.1 соответственно). Культивирование вируса и экспериментальное заражение проводили на клетках эпителия почки африканской зелёной марышки Vero CCL81 (ATCC) (далее — клетки Vero) и клетках рака лёгких человека Calu-3 HTB-55 (ATCC) (далее — клетки Calu-3). Клетки культивировали при 37°C в питательной среде DMEM на основе буфера Эрла («ПанЭко») с добавлением 5% эмбриональной сыворотки коров («Gibco»), 300 мкг/мл L-глутамин («ПанЭко»), 40 мкг/мл гентамицин («ПанЭко») в атмосфере 5% CO₂. Трёхдневный монослой клеток Vero или Calu-3 заражали вирусом SARS-CoV-2 при желаемой множественности заражения (MOI). Адсорбцию вируса проводили в CO₂-инкубаторе в течение 60 мин, затем добавляли поддерживающую среду (DMEM, 300 мкг/мл L-глутамин, 40 мкг/мл гентамицин) и инкубировали при 23–39°C в течение 3–8 сут (в зависимости от варианта вируса и цели эксперимента) в атмосфере 5% CO₂. Для исследования кинетики репродукции вируса культуральную жидкость ежедневно отбирали в течение 4–8 сут и хранили при –80°C до момента исследования методом титрования или количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ).

Животные. В работе использовали 36 золотистых сирийских хомячков-самок массой 40–50 г (НПП «Питомник лабораторных животных» ИБХ РАН). Животные были случайным образом рас-

¹ WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard.
URL: <https://covid19.who.int/> (дата обращения: 13.05.2022).

² The GISAID Initiative.
URL: <https://www.gisaid.org/> (дата обращения: 13.05.2022).

Последовательности праймеров, зонда и олигонуклеотида, использованных в работе
Sequences of primers, probe, and oligonucleotide used in the tests

Название Name	Последовательность 5'-3' Sequence 5'-3'	Назначение Application	Источник Source
COVID-19-N-F	GCGTTCCTTCGGAATGTGCG	Прямой праймер Forward primer	[22]
COVID-19-N-R	TTGGATCTTTGTCAATCAATTTG	Обратный праймер Reverse primer	
COVID-19-N-P	FAM-AACGTGGTTGACCTACACAGGT-BHQ1	Зонд Probe	
COVN-PC	GCGTTCCTTCGGAATGTGCGCGCATTGGCATGGAAGTCACACCTTCGGGAA CGTGGTTGACCTACACAGGTGCCATCAAATTTGGATGACAAAGATCCAA	Калибровочный образец Calibration sample	Собственный дизайн In-house design

пределены по 4 группам ($n = 9$), в том числе три группы для заражения вариантами SARS-CoV-2 и контрольная группа незаражённых животных. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, 23.07.2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом НИИВС им. И.И. Мечникова (протокол № 2 от 24.05.2021).

Титрование вируса. Титр вируса SARS-CoV-2 определяли по конечной точке проявления цитопатического действия (ЦПД) в культуре клеток Vero. В лунки 96-луночного планшета вносили последовательные десятикратные разведения вируса в поддерживающей среде и инкубировали в течение 5 сут в атмосфере 5% CO₂ при 37°C (*са*-варианты — при 30°C). Учёт результатов титрования проводили визуально путём микроскопического исследования клеточного монослоя на наличие характерного ЦПД на 5-е сутки после заражения (округление и частичное открепление клеток от монослоя). Титр вируса рассчитывали по М. Ramakrishnan [21] и выражали в lg ТЦД₅₀/мл.

Количественное определение РНК вируса SARS-CoV-2. Выделение вирусной РНК проводили двумя методами: коммерческим набором реагентов для экстракции ДНК/РНК из биологического материала «МагноПрайм ЮНИ» («НекстБио») в соответствии с инструкцией производителя либо с помощью реагента Triton X-100. Для выделения вирусной РНК с помощью реагента Triton X-100 к 100 мкл вирусосодержащей культуральной жидкости добавляли 10 мкл 4,5% раствора Triton X-100, полученную смесь перемешивали и замораживали. После размораживания образец перемешивали, разбавляли водой без РНКаз в 10 раз и незамедлительно использовали в реакции ОТ-ПЦР-РВ (при расчёте концентрации вирусной РНК применяли поправочный коэффициент 10).

Для выявления вирусной РНК в реакции ОТ-ПЦР-РВ были использованы праймеры и зонд к гену нуклеокапсида N вируса SARS-CoV-2: COVID-19-

N-F, COVID-19-N-R, COVID-19-N-P (таблица) [22]. Для постановки реакции ОТ-ПЦР-РВ использовали набор реагентов «2,5× реакционная смесь для ПЦР-РВ с Taq ДНК-полимеразой» и обратную транскриптазу MMLV («Синтол»). Реакционная смесь объёмом 25 мкл содержала по 10 пмоль каждого праймера и 5 пмоль зонда, Taq ДНК-полимеразу, 30 ед. обратной транскриптазы. Температурно-временной режим: 45°C — 10 мин (1 цикл); 95°C — 5 мин (1 цикл); 95°C — 5 с, 55°C — 45 с (45 циклов). Реакцию проводили в амплификаторе «DTprime» («ДНК-технология»). Все праймеры и зонды синтезированы в «Синтол». Для построения калибровочного графика использовали образцы, полученные в результате последовательных десятикратных разведений синтетического олигонуклеотида COVN-PC (таблица) с известной концентрацией.

Секвенирование генома коронавирусов. Для получения пула ампликонов для последующего полногеномного секвенирования использовали набор NEBNext® ARTIC SARS-CoV-2 для подготовки библиотек (Oxford Nanopore Technologies) («New England Biolabs»). Данный набор разработан для проведения полногеномного секвенирования SARS-CoV-2 на основе протокола «SARS-CoV-2 McGill Nanopore sequencing protocol SuperScript IV_42C_ArticV3» [23]. Для подготовки полученного пула использовали наборы Ligation Sequencing kit 1D и Native Barcoding Kit 1D («Oxford Nanopore Technologies»). Секвенирование проводили в проточной ячейке Flow Cell R9.4 с использованием программного обеспечения «MinKNOW» («Oxford Nanopore Technologies»). Сборку генома осуществляли в программе «Minimap2 v. 2.24»³.

Инактивация вируса SARS-CoV-2 ультрафиолетом (УФ). Культуральную жидкость из флаконов с клетками Vero собирали через 72 ч после заражения вирусом, осветляли центрифугированием при 4000 об/мин и титровали. Инактивацию вируса проводили путём обработки ультрафиолетовым светом ($\lambda = 253,7$ нм) бактерицидного облуча-

³ URL: <https://github.com/lh3/minimap2>

теля «TUV 30W/G30 T8» («Philips»). Чашку Петри диаметром 150 мм с вирусным материалом объёмом 50 мл помещали под лампу на расстоянии 30 см и облучали в течение 4 мин с трёхкратным перемешиванием жидкости через равные промежутки времени. Контроль инактивации вируса проводили путём 3 «слепых» пассажей облучённого вирусного материала на культуре клеток Vero, проводя мониторинг ЦПД и концентрации вирусной РНК на каждом пассажном уровне.

Оценка антигенных свойств SARS-CoV-2, инактивированного УФ. Разведения SARS-CoV-2, инактивированного УФ, анализировали в реакции иммунохроматографии с помощью набора реагентов «SARS-CoV-2 Rapid Antigen Test» («SD Biosensor Inc.») согласно инструкции по применению.

Оценка *ts*-фенотипа *sa*-вариантов SARS-CoV-2. Клетки Vero заражали *sa*-вариантами SARS-CoV-2 и штаммом Dubrovka при MOI 0,001 и 0,00001 и инкубировали при 37°C и 39°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 3 сут. Ежедневно отбирали образец культуральной жидкости и хранили при –80°C до исследования. В отобранных образцах определяли титр вируса и концентрацию вирусной РНК. Разница в титре вируса или концентрации вирусной РНК по сравнению с заражением штаммом Dubrovka на 4,0 lg и более свидетельствовала о наличии у вируса *ts*-фенотипа.

Оценка аттенуационного (*att*) фенотипа *sa*-вариантов SARS-CoV-2. Сирийских хомяков заражали интраназально штаммом Dubrovka и *sa*-вариантами вируса в дозе 4,0 lg ТЦД₅₀ ($n = 9$ в каждой группе). Ежедневно оценивали состояние животных и каждые 2 сут проводили контроль массы тела. Через 4 сут после заражения по 4 хомяка из каждой группы гуманно умерщвляли, лёгкие и мозг извлекали, гомогенизировали и хранили при –80°C до исследования. У остальных животных продолжали контролировать состояние и массу тела до 8 сут после заражения. В гомогенатах органов определяли титр вируса и концентрацию вирусной РНК. Достоверная разница в массе тела титре вируса или концентрации вирусной РНК в лёгких и мозге по сравнению с заражением штаммом Dubrovka свидетельствовала о наличии у вируса *att*-фенотипа.

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ). Образцы инактивированного УФ вирусного материала были нанесены на сетки для ТЭМ с углеродной подложкой («Ted Pella Carbon Type B», 300 mesh) и негативно контрастированы 1% уранилацетатом. Изображения ТЭМ были получены с помощью электронного микроскопа «JEM-2100» («Jeol») 200 кВ, оснащённого камерой «Gatan Orius SC200D» (2k × 2k).

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения «Graphpad

Prism v.5.03». Достоверность разницы определяли согласно U-критерию Манна–Уитни с 95% доверительным интервалом.

Требования к безопасности работ. Все работы с вирусом SARS-CoV-2 проводили в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21 в условиях лаборатории 3-го уровня биобезопасности.

Результаты

Получение холодаадаптированных вариантов SARS-CoV-2

В работе использован лабораторный штамм SARS-CoV-2 Dubrovka, ранее охарактеризованный в НИИВС им. И.И. Мечникова. Штамм Dubrovka был получен летом 2020 г. путём изоляции в культуре клеток Vero из клинического образца пациента с подтверждённым диагнозом COVID-19. Идентификацию вируса проводили методами ОТ-ПЦР-РВ, реакции нейтрализации с сыворотками реконвалесцентов COVID-19 и полногеномного секвенирования (номер GenBank MW514307.1), показавших принадлежность изолята к виду *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus* (вирус SARS-CoV-2, клада GR по классификации GISAID, линия B.1.1.317 по классификации Pangolin) [20]. Особенностью штамма Dubrovka является 27 нт делеция в гене *S* (9 аминокислот с 68 по 76 а.о. — YMSLGPMVL) по сравнению с геном *S* штамма Wuhan-Hu-1 (номер GenBank NC_045512.2) [20]. Все варианты штамма Dubrovka, полученные в настоящем исследовании, сохраняли эту делецию.

С целью изучения адаптационных способностей SARS-CoV-2 проведено длительное пассирование штамма Dubrovka в культуре клеток Vero при постоянной температуре 37°C или постепенно понижаемой до 23°C температуре в течение 42 пассажей. Полученные варианты вируса были названы Dubrovka-37 и Dubrovka-ca (cold-adapted) соответственно (рис. 1). Получение варианта Dubrovka-ca проводили по следующей схеме: 10 пассажей при

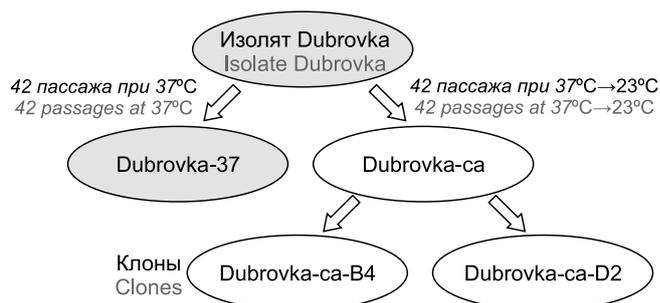


Рис. 1. Схема адаптации SARS-CoV-2 к культуре клеток Vero и выращиванию при пониженной температуре.

Fig. 1. The schematic diagram of SARS-CoV-2 adaptation to the Vero cell culture and growth at low temperature.

37°C, далее температуру культивирования понижали на 1°C через каждые 2 пассажа, заключительные 6 пассажей проводили при 23°C (всего 42 пассажа). Далее путём трёхкратного клонирования методом предельных разведений при 23°C на основе варианта Dubrovka-ca были получены два клона — В4 и D2 (далее — варианты Dubrovka-ca-B4 и Dubrovka-ca-D2).

Для вариантов штамма Dubrovka: Dubrovka-37, Dubrovka-ca, Dubrovka-ca-B4 и Dubrovka-ca-D2 были определены полногеномные последовательности (номера GenBank ON380441.1, ON040960.1, ON059701.1 и ON040961.1 соответственно). Первичный анализ геномов разных вариантов штамма Dubrovka выявил много нуклеотидных замен, большинство из которых были несинонимичными (приводили к аминокислотной замене). В геноме варианта Dubrovka-37 в результате длительной адаптации к культуре клеток Vero при 37°C произошло 7 нуклеотидных замен, из которых 5 были несинонимичными. В геноме варианта Dubrovka-ca в результате холодовой адаптации в культуре клеток Vero произошло 17 нуклеотидных замен, из которых 16 замен были несинонимичными. Вместе с тем в геномах клонов ca-вариантов: Dubrovka-ca-B4 и Dubrovka-ca-D2 обнаружены 16 и 20 нуклеотидных замен, которые привели к 14 и 17 аминокислотным заменам соответственно. В гене *S* локализовано наибольшее число несинонимичных замен: 2 — в геноме Dubrovka-37, 5 — Dubrovka-ca, 6 — Dubrovka-ca-B4, 7 — Dubrovka-ca-D2. Примечательно, что в геноме варианта Dubrovka-ca-D2, обладающего *ts*-фенотипом, из 20 нуклеотидных замен 11 являются уникальными по отношению к Dubrovka-37, Dubrovka-ca и Dubrovka-ca-B4; из них 9 приводят к аминокислотным заменам.

Фенотипическая характеристика вариантов SARS-CoV-2

При пассировании в культуре клеток Vero при 37°C титр вируса возрастал (от 4,3 lg ТЦД₅₀/мл на 2-м пассаже до 9,0 lg ТЦД₅₀/мл на 30-м пассаже), а ЦПД становилось все более выраженным. Если при заражении вирусом 2-го пассажа выживаемость клеток Vero на 5-е сутки после инфицирования составляла 92%, то уже к 14-му пассажу достигала минимального уровня (2–4%) [20]. Сроки проявления ЦПД в процессе холодовой адаптации изменялись с 2–3 сут при 37°C до 5–7 сут после инфицирования при 23°C. При заражении вариантом Dubrovka-ca ЦПД проявлялось в нарушении целостности монослоя, появлении скоплений округлённых клеток без открепления клеток от поверхности флакона (рис. 2).

Вариант Dubrovka-ca при 23°C размножался значительно медленнее, чем родительский штамм Dubrovka при оптимальной для него температуре 37°C. В связи с этим клетки заражали большей дозой

варианта Dubrovka-ca и проводили более длительную инкубацию. Если пик репродукции штамма Dubrovka (17 пассаж) при 37°C (МОИ 0,00001) приходился на 2-е сутки, достигая 9,0 lg ТЦД₅₀/мл, то для варианта Dubrovka-ca при 23°C (МОИ 0,001) — на 7-е сутки, достигая 8,0 lg ТЦД₅₀/мл (рис. 3). Репродукция вируса сопровождалась накоплением в культуральной жидкости вирусной РНК (рис. 3).

Вариант Dubrovka-37 при 23°C не размножался в культуре клеток Vero, тогда как варианты Dubrovka-ca, Dubrovka-ca-B4 и Dubrovka-ca-D2 на 7-е сутки достигали титра 4,5–8,0 ТЦД₅₀/мл в зависимости от МОИ.

Методом иммунохроматографии во всех инактивированных УФ препаратах вируса — Dubrovka, Dubrovka-ca-B4 и Dubrovka-ca-D2 — был выявлен антиген SARS-CoV-2. Методом ТЭМ в этих же препаратах обнаружены вирусоподобные частицы с морфодиагностическими признаками коронавируса: вирионы имели округлую форму с характерными шипами 12–15 нм на оболочке (тримеры S-белка) (рис. 4). Диаметр вириона составлял 90–110 нм.

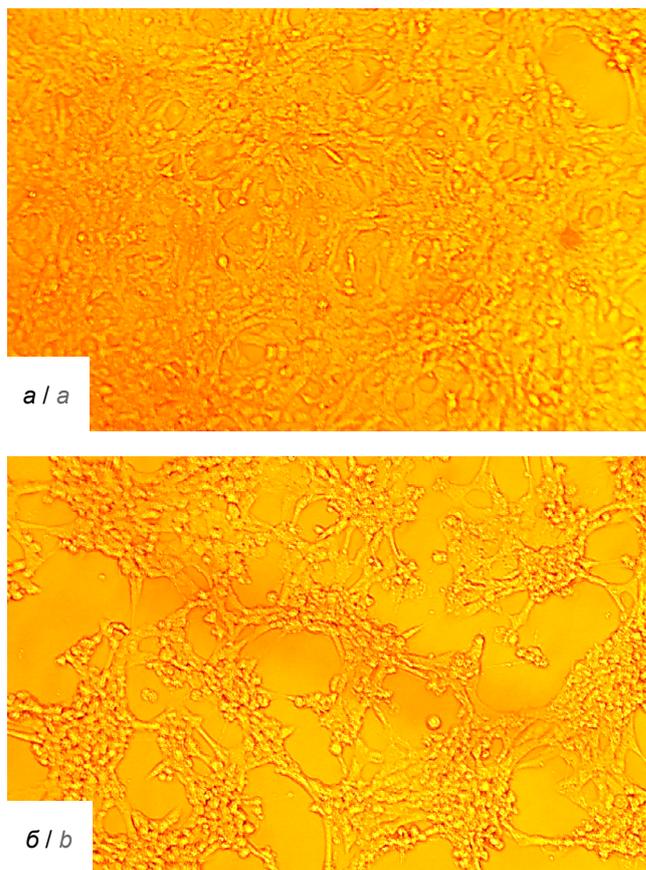


Рис. 2. Цитопатогенное действие штамма Dubrovka-ca в культуре клеток Vero при 23°C (7-е сутки после инфицирования).

a — незаражённые клетки; *б* — Dubrovka-ca. MOI 0,001.

Fig. 2. Cytopathic effect of the Dubrovka-ca strain in the Vero cell culture at 23°C (the 7th day after the infection).

a — non-infected cells; *b* — Dubrovka-ca. MOI 0.001.

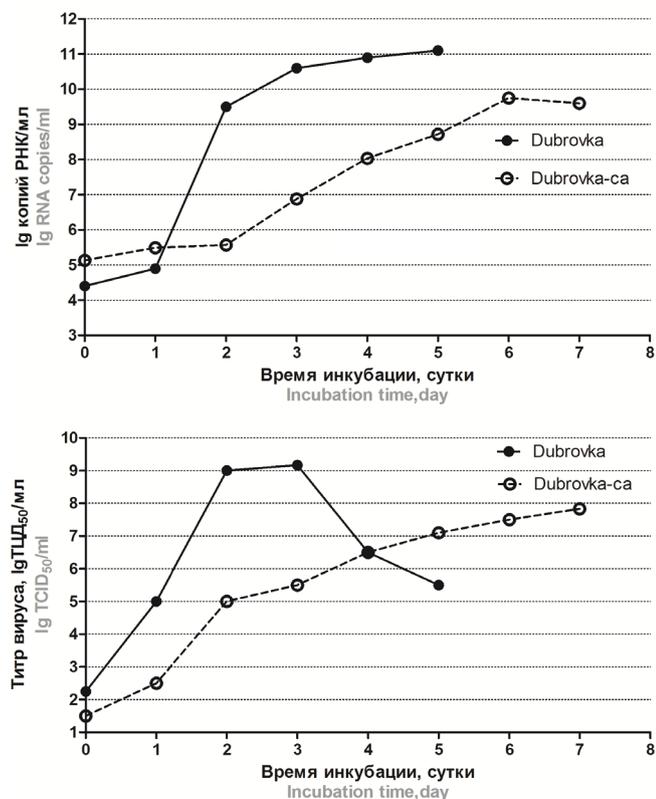


Рис. 3. Кинетика репродукции вируса и накопления вирусной РНК штамма Dubrovka (при 37°C) и варианта Dubrovka-ca (при 23°C) в культуре клеток Vero.

Приведены средние значения по результатам 2 независимых экспериментов. Заражение штаммом Dubrovka проводили при MOI 0,00001, вариантом Dubrovka-ca — при MOI 0,001.

Fig. 3. Kinetics of virus replication and viral RNA accumulation for the Dubrovka strain (at 37°C) and the Dubrovka-ca variant (at 23°C) in Vero cell culture.

The results of 2 independent tests are presented as mean values. The infection with the Dubrovka strain was performed at MOI 0.00001, the infection with the Dubrovka-ca variant — at MOI 0.001.

Форма и размер полученных вирусоподобных частиц хорошо согласуются с полученными ранее микрофотографиями вируса SARS-CoV-2 [5, 24].

Полученные клоны варианта Dubrovka-ca были исследованы на наличие температурочувствительного (*ts*) фенотипа, который заключается в неспособности вируса эффективно размножаться при 37°C или 39°C. Интенсивность репродукции клонов Dubrovka-ca-B4 и Dubrovka-ca-D2 (MOI 0,001) при температуре культивирования 37°C клеток Vero была высокой и достоверно не отличалась от штамма Dubrovka (рис. 5). При температуре культивирования 39°C вариант Dubrovka-ca-D2 не размножался (рис. 6), а концентрация вирусной РНК в культуральной жидкости была снижена на 4,0–6,0 lg по сравнению со штаммом Dubrovka и вариантом Dubrovka-ca-B4 (рис. 5). Таким образом, установлено, что вариант Dubrovka-ca-D2 обладает выраженным *ts*-фенотипом. У варианта Dubrovka-ca-B4 также выявлены признаки *ts*-фенотипа, но только при низкой MOI (0,00001) и температуре 39°C — на 3-и сутки разница в титре вируса со штаммом Dubrovka составляла 3,0 lg (рис. 6).

Варианты Dubrovka-37, Dubrovka-ca-B4, адаптированные на протяжении более 40 пассажей к культуре клеток почки обезьяны Vero, утратили способность размножаться в культуре клеток рака лёгких человека Calu-3. Вариант Dubrovka-ca-D2 в клетках Calu-3 размножался, но значительно медленнее штамма Dubrovka (рис. 7).

С целью выявления аттенуационного (*att*) фенотипа *ca*-вариантов SARS-CoV-2 был проведён эксперимент по интраназальному заражению хомяков. У хомяков, заражённых *ca*-вариантами вируса SARS-CoV-2, не наблюдались задержка прироста массы тела и изменения в поведении по сравнению с отрицательным контролем. Напротив, при зараже-

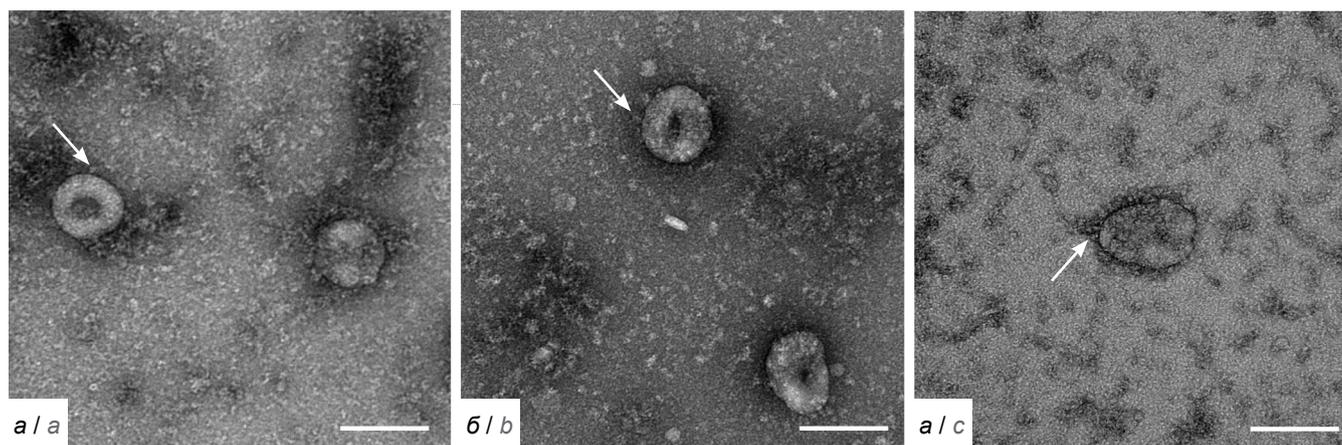


Рис. 4. Электронная микрофотография инактивированных УФ вариантов SARS-CoV-2.

а — Dubrovka; б — Dubrovka-ca-B4; в — Dubrovka-ca-D2. ТЭМ. Негативное контрастирование 1% уранилацетатом. Стрелками отмечены тримеры S-белка на поверхности коронавируса. Масштабный отрезок — 100 нм.

Fig. 4. Electron microphotography of UV inactivated variants of SARS-CoV-2.

а — Dubrovka; б — Dubrovka-ca-B4; в — Dubrovka-ca-D2. TEM. Negative contrasting with 1% uranyl acetate. The arrow shows S-protein trimers on the surface of the coronavirus. The scale bar — 100 nm.

нии вирулентным вирусом (штамм Dubrovka) отмечалась достоверная задержка в приросте массы тела, составившая на 2-е сутки после заражения 8,2%, на 4-е — 13,4%, на 6-е — 10,5% ($p < 0,05$), тогда как на 8-е сутки разница была недостоверной (рис. 8). У животных, зараженных вирулентным штаммом, на 2–6-е сутки также наблюдались снижение аппетита, вялость и сонливость.

В лёгких и мозге животных на 4-е сутки после заражения *ca*-вариантами вируса концентрация вирусной РНК была достоверно более низкой по сравнению с контрольной группой, заражённой вирулентным штаммом Dubrovka (рис. 9). Наименьшая концентрация вирусной РНК в органах наблюдалась при заражении вариантом Dubrovka-*ca*-D2: в лёгких — 6,5 lg копий РНК/мл, в мозге — 3,3 lg

копий РНК/мл, что на 1,6 и 3,2 lg соответственно ниже, чем в контрольной группе ($p < 0,05$).

Титр вируса в гомогенатах лёгких животных на 4-е сутки после заражения *ca*-вариантами вируса составлял 5,0 lg ТЦД₅₀/мл, что на 1,2 lg ниже, чем в контрольной группе ($p < 0,05$) (рис. 10). Инфекционный вирус в мозге на 4-е сутки после заражения *ca*-вариантами при титровании не обнаруживался, тогда как при заражении штаммом Dubrovka титр вируса в гомогенате мозга достигал 5,0 lg ТЦД₅₀/мл (рис. 10). Важно отметить, что при титровании вируса гомогенаты органов в разведениях 1 : 10 и 1 : 100 были токсичными для клеток, что затрудняло учёт вирусного ЦПД и снижало чувствительность титрования.

Обсуждение

Массовое применение живых вирусных вакцин, входящих в национальные календари иммунизации, позволило ликвидировать в глобальном масштабе натуральную оспу и поставить в развитых странах на грань исчезновения такие заболевания, как корь, краснуха, ветряная оспа, эпидемический паротит и полиомиелит [25]. Штаммы

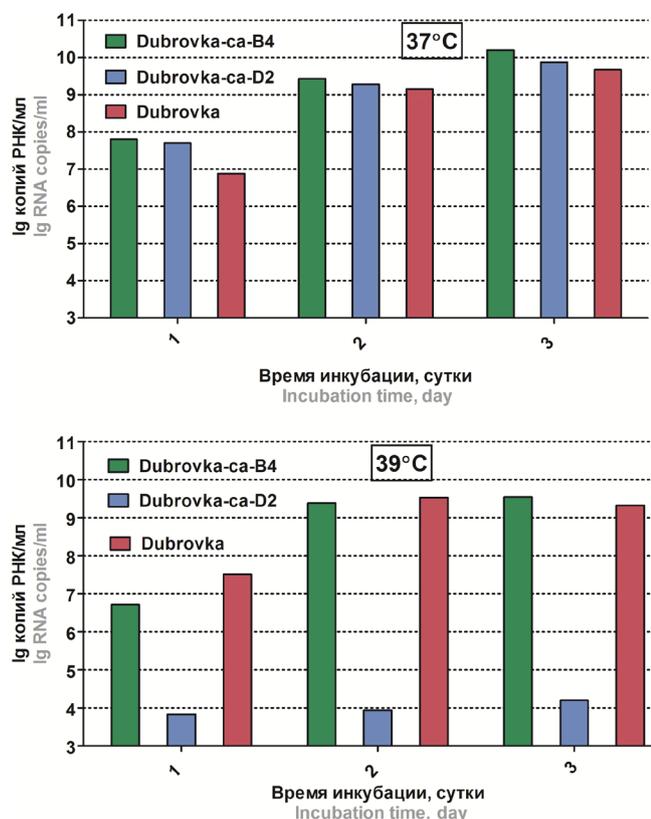


Рис. 5. Накопление вирусной РНК в культуре клеток Vero при заражении штаммом Dubrovka и вариантами Dubrovka-*ca*-B4 и Dubrovka-*ca*-D2 при температуре культивирования 37°C или 39°C.

Клетки заражали при MOI = 0,001, ежедневно отбирали образец культуральной жидкости и определяли концентрацию вирусной РНК. Приведены средние значения по результатам 2 независимых экспериментов.

Fig. 5. Accumulation of the viral RNA in the Vero cell culture after the infection with the Dubrovka strain and Dubrovka-*ca*-B4 and Dubrovka-*ca*-D2 variants at the culture temperature of 37°C or 39°C.

The cells were infected at MOI = 0.001; samples of the culture liquid were collected daily, and the concentration of the viral RNA was measured. The results of 2 independent tests are presented as mean values.

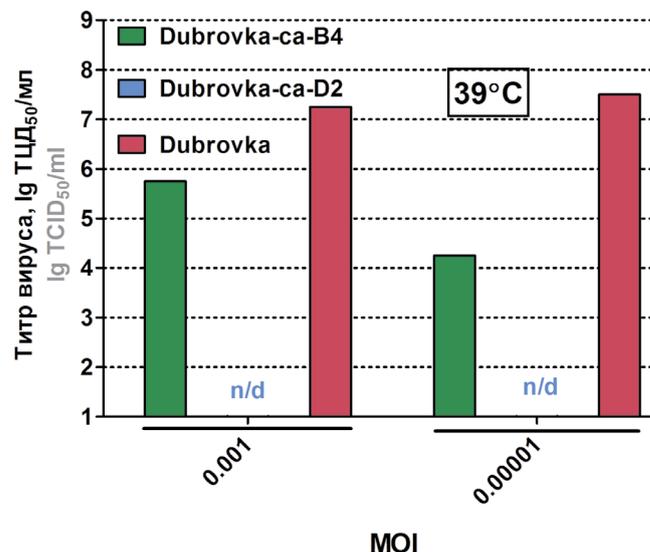


Рис. 6. Титр вируса на 3-и сутки после инфицирования культуры клеток Vero штаммом Dubrovka и вариантами Dubrovka-*ca*-B4 и Dubrovka-*ca*-D2 при температуре культивирования 39°C и разной MOI.

Клетки заражали вариантами вируса и через 72 ч определяли титр вируса в культуральной жидкости. Приведены средние значения по результатам 2 независимых экспериментов. n/d — не обнаружено.

Fig. 6. The virus titer on the 3rd day after the Vero cell culture had been infected with the Dubrovka strain and Dubrovka-*ca*-B4 and Dubrovka-*ca*-D2 variants; at the culture temperature of 39°C and different MOI.

The cells were infected with virus variants, and the virus titer was measured in the culture liquid 72 hours after the infection. The results of 2 independent tests are presented as mean values. n/d — not detected.

вирусов, входящие в состав большинства живых вирусных вакцин, были получены при аттенуации диких вариантов соответствующих вирусов путём адаптации к выращиванию в условиях пониженной температуры и/или в клетках животных [25, 26]. В многочисленных исследованиях доказано, что вирусы человека и животных могут быть адаптированы к росту при субоптимальной пониженной тем-

пературе [19]. Почти во всех случаях наблюдалась корреляция между приобретением этими вирусами температурной чувствительности в культуре ткани и аттенуацией у нормального хозяина — животного или человека [19]. Экспериментально доказано, что путём холодной адаптации возможно получение аттенуированного вируса, который при иммунизации обеспечивает безопасную и эффективную

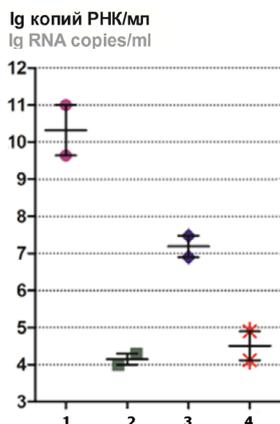


Рис. 7. Концентрация вирусной РНК в клетках Calu-3, заражённых вариантами SARS-CoV-2, на 3-и сутки после инфицирования при MOI 0,001.

1 — штамм Dubrovka (2-й пассаж); 2 — Dubrovka-ca-B4; 3 — Dubrovka-ca-D2; 4 — Dubrovka-37. Приведены средние значения по результатам 2 независимых экспериментов.

Fig. 7. Concentration of the viral RNA in Calu-3 cells infected with SARS-CoV-2 variants, the 3rd day after the infection, at MOI 0.001.

1 — Dubrovka strain (the 2nd passage); 2 — Dubrovka-ca-B4; 3 — Dubrovka-ca-D2; 4 — Dubrovka-37. The results of 2 independent tests are presented as mean values.

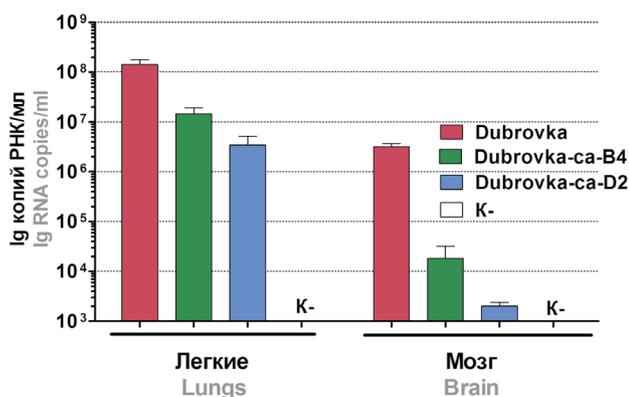


Рис. 9. Концентрация вирусной РНК в гомогенатах лёгких и мозга хомяков, заражённых интраназально штаммом Dubrovka и вариантами Dubrovka-ca-B4 и Dubrovka-ca-D2, на 4-е сутки после инфицирования.

$n = 4$ на группу. К- — незаражённые хомяки.

Fig. 9. Concentration of the viral RNA in lung and brain homogenates from hamsters infected intranasally with the Dubrovka strain and Dubrovka-ca-B4 and Dubrovka-ca-D2 variants, 4th day after the infection.

$n = 4$ per group. К- — non-infected hamsters.

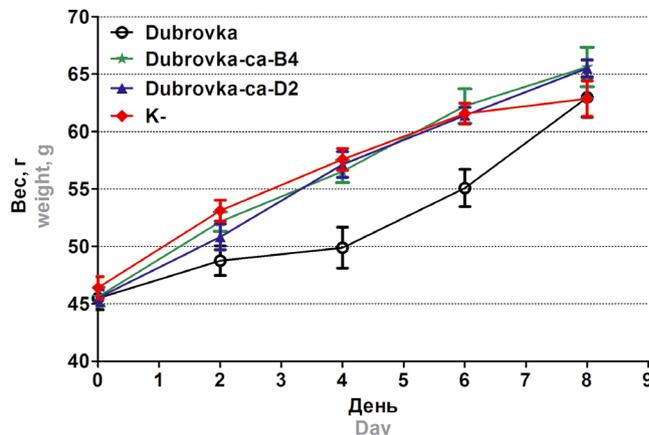


Рис. 8. Кинетика массы тела хомяков, заражённых интраназально штаммом Dubrovka и вариантами Dubrovka-ca-B4 и Dubrovka-ca-D2.

С 0-х по 4-е сутки — $n = 9$ на группу, с 6-х по 8-е сутки — $n = 5$ на группу. Доза заражения — 4,0 lg ТЦД₅₀.

К- — незаражённые хомяки.

Fig. 8. Kinetics of the weight of hamsters infected intranasally with the Dubrovka strain and Dubrovka-ca-B4 and Dubrovka-ca-D2 variants.

From the 0th to the 4th day — $n = 9$ per group; from the 6th to the 8th day — $n = 5$ per group. The infective dose — 4.0 lg TCID₅₀.

К- — non-infected hamsters.

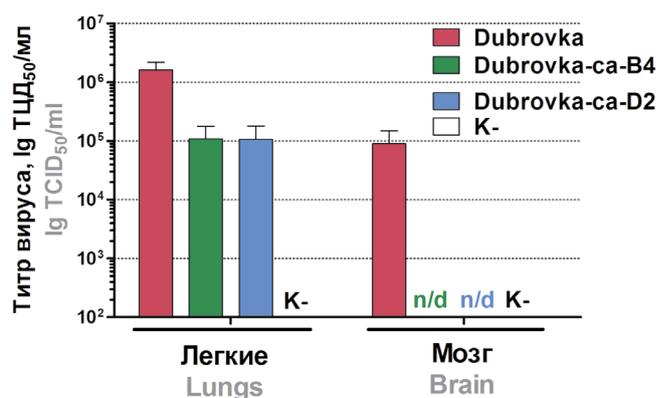


Рис. 10. Титр вируса в гомогенатах лёгких и мозга хомяков, заражённых интраназально штаммом Dubrovka и вариантами Dubrovka-ca-B4 и Dubrovka-ca-D2, на 4-е сутки после инфицирования.

$n = 4$ на группу. К- — незаражённые хомяки.

Fig. 10. The virus titer in lung and brain homogenates from hamsters infected intranasally with the Dubrovka strain and Dubrovka-ca-B4 and Dubrovka-ca-D2 variants, the 4th day after the infection.

$n = 4$ per group. К- — non-infected hamsters.

защиту от заражения вирусом дикого типа [19]. Разработанные в СССР и США сезонные живые аттенуированные интраназальные гриппозные вакцины [27–29] выгодно отличаются от инактивированных вакцин тем, что индуцируют системный, мукозальный и клеточный иммунитет, обеспечивают широкую перекрёстную протективную активность и простоту введения. Применение живых вирусных вакцин обосновано не только их высокой иммунологической эффективностью, но и экономической целесообразностью, поскольку отличаются низкой себестоимостью производства [25].

В то же время, по данным ВОЗ на 13.05.2022, из 153 лицензированных и проходящих клинические испытания вакцин против COVID-19 только 2 (1,3%) вакцины созданы на основе живых аттенуированных штаммов: COVI-VAC (Codagenix/Serum Institute of India, Индия), MV-014-212 («Meissa Vaccines, Inc.», США)⁴. Обе вакцины являются интраназальными. Аттенуация использованных в этих вакцинах штаммов достигалась с применением технологии деоптимизации кодонов.

В нашем исследовании показана возможность адаптации SARS-CoV-2 к выращиванию при непермиссивной для дикого вируса температуре 23°C и получения *ts*-мутантов. Полученные *ca*-варианты вируса Dubrovka-*ca*-B4 и Dubrovka-*ca*-D2 имели значительные геномные отличия по сравнению с родоначальным штаммом Dubrovka, эффективно размножались при 23°C, но только вариант Dubrovka-*ca*-D2 имел *ts*-фенотип, т.е. не размножался при 39°C. Более того, адаптированные к культуре клеток почки обезьяны Vero клоны Dubrovka-*ca*-D2 и Dubrovka-*ca*-B4 достоверно медленнее дикого штамма размножались при 37°C в культуре клеток лёгких человека Calu-3, что наряду с *ts*-фенотипом может быть маркером аттенуации вируса по отношению к человеку. В связи с этим у нас были основания предполагать, что как обладающий *ts*-фенотипом клон Dubrovka-*ca*-D2, так и клон Dubrovka-*ca*-B4, не обладающий *ts*-фенотипом, имеют пониженную вирулентность, т.е. аттенуированы.

На животной модели COVID-19 в эксперименте на сирийских хомяках предположение об аттенуации *ca*-вариантов штамма Dubrovka нашло убедительное подтверждение. Заражение хомяков вариантами Dubrovka-*ca*-B4 и Dubrovka-*ca*-D2 не вызывало у них при интраназальном заражении снижения аппетита, вялости, сонливости и замедления прироста массы, в отличие от вирулентного штамма Dubrovka. В лёгких и головном мозге животных, заражённых *ca*-вариантами, концентрация

вирусной РНК и содержание инфекционного вируса были ниже на 1,2–3,3 lg по сравнению с вирулентным штаммом, причём наименьшая репродуктивная активность в условиях *in vivo* отмечалась у *ts*+-клона Dubrovka-*ca*-D2. Примечательно, что в мозге хомяков, заражённых *ca*-вариантами, инфекционный вирус выявлен не был, тогда как при заражении вирулентным штаммом Dubrovka титр вируса достигал 5,0 lg ТЦД₅₀/мл гомогената. С учетом известной нейровирулентности SARS-CoV-2 для человека, снижение репродуктивной активности *ca*-вариантов вируса в головном мозге хомяков при интраназальном введении уменьшает вероятность неврологических повреждений *in vivo* и является важным маркером аттенуации вируса. Таким образом, полученные *ca*-варианты Dubrovka-*ca*-B4 и Dubrovka-*ca*-D2 обладают выраженным *att*-фенотипом для сирийских хомяков и представляют интерес для дальнейшего исследования в качестве кандидатных вакцинных штаммов для создания живой аттенуированной вакцины против COVID-19.

Важно отметить, что аттенуационный фенотип *ca*-вариантов вируса был получен для сирийских хомяков и требует дальнейшего исследования на других моделях. Данные по вирулентности вируса, полученные на животных моделях, невозможно безоговорочно экстраполировать на человека. Доклинические испытания на модельных животных позволяют лишь приблизиться к пониманию безопасности клинического применения и восприимчивости человека по отношению к аттенуированному штамму вируса. Кроме того, серьёзным фактором риска применения живой аттенуированной вакцины является возможность реверсии вирулентности вакцинного штамма в результате точечных мутаций либо рекомбинаций. В связи с этим необходимы дальнейшие исследования генетической стабильности *ca*-вариантов SARS-CoV-2 и связанной с ней стабильности *att*-фенотипа.

В научной литературе описано получение *ca*-штаммов SARS-CoV-2, обладающих *ts*-фенотипом, которые не только имели *att*-фенотип, но и при интраназальном введении были способны индуцировать у иммунизированных животных (сирийских хомяков или трансгенных мышей hACE-2 (K18-hACE2) протективный иммунный ответ против заражения вирулентным штаммом SARS-CoV-2 [30–32]. Для получения *ts*+ штаммов SARS-CoV-2 в указанных работах применяли различные подходы. В работе S. Seo и соавт. [30] применялся схожий с нашим исследованием подход — длительное пассирование при постепенном снижении температуры от 37°C до 22°C в клетках Vero. В работе S. Okamura и соавт. на основе клинического изолята SARS-CoV-2 была получена большая библиотека из 659 клонов со случайными мутациями, из которых были отобраны варианты, вызывавшие ЦПД в

⁴ R&D Blue Print. World Health Organization. COVID-19 vaccine tracker and landscape. URL: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines> (дата обращения: 13.05.2022).

культуре клеток при 32°C, но не при 37°C [32]. Атенуация вируса при получении вакцинного штамма должна выдерживать баланс между ослаблением вирулентности и сохранением способности вызывать протективный иммунный ответ. В работах S. Seo и соавт. и S. Okamura и соавт. экспериментально доказана возможность сохранения протективной активности у аттенуированных *ts*-мутантов SARS-CoV-2 [30, 32]. В связи с этим дальнейшее исследование протективной активности полученных в настоящей работе вариантов Dubrovka-ca-B4 и Dubrovka-ca-D2 на животной модели COVID-19 представляет большой практический интерес.

Заключение

Полученные в настоящей работе аттенуированные *ca*-варианты SARS-CoV-2 Dubrovka-ca-B4 и Dubrovka-ca-D2 представляют интерес для дальнейшего исследования в качестве кандидатных вакцинных штаммов для создания живой аттенуированной вакцины против COVID-19.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Francis A.I., Ghany S., Gilkes T., Umakanthan S. Review of COVID-19 vaccine subtypes, efficacy and geographical distributions. *Postgrad. Med. J.* 2022; 98(1159): 389–94. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2021-140654>
- Marfe G., Perna S., Shukla A.K. Effectiveness of COVID-19 vaccines and their challenges (Review). *Exp. Ther. Med.* 2021; 22(6):1407. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10843>
- Marcelin J.R., Pettifor A., Janes H., Brown E.R., Kublin J.G., Stephenson K.E. COVID-19 vaccines and SARS-CoV-2 transmission in the era of new variants: A review and perspective. *Open Forum Infect. Dis.* 2022; 9(5): ofac124. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofac124>
- Kandimalla R., Chakraborty P., Vallamkondu J., Chaudhary A., Samanta S., Reddy P.H., et al. Counting on COVID-19 vaccine: insights into the current strategies, progress and future challenges. *Biomedicines.* 2021; 9(11): 1740. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111740>
- Kozlovskaya L.I., Pinaeva A.N., Ignatyev G.M., Gordeychuk I.V., Volok V.P., Rogova Y.V., et al. Long-term humoral immunogenicity, safety and protective efficacy of inactivated vaccine against COVID-19 (CoviVac) in preclinical studies. *Emerg. Microbes Infect.* 2021; 10(1): 1790–806. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1971569>
- Gómez-Carballa A., Pardo-Seco J., Bello X., Martínón-Torres F., Salas A. Superspreading in the emergence of COVID-19 variants. *Trends Genet.* 2021; 37(12): 1069–80. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.09.003>
- Nikonova A.A., Faizuloev E.B., Gracheva A.V., Isakov I.Y., Zverev V.V. Genetic diversity and evolution of the biological features of the pandemic SARS-CoV-2. *Acta Naturae.* 2021; 13(3): 77–88. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11337>
- Choi J.Y., Smith D.M. SARS-CoV-2 variants of concern. *Yonsei Med. J.* 2021; 62(11): 961–8. <https://doi.org/10.3349/ymj.2021.62.11.961>
- Mathieu E., Ritchie H., Ortiz-Ospina E., Roser M., Hasell J., Appel C., et al. A global database of COVID-19 vaccinations. *Nat. Hum. Behav.* 2021; 5(7): 947–53. <https://doi.org/10.1038/s41562-021-01122-8>
- Dupont L., Snell L.B., Graham C., Seow J., Merrick B., Lechmere T., et al. Neutralizing antibody activity in convalescent sera from infection in humans with SARS-CoV-2 and variants of concern. *Nat. Microbiol.* 2021; 6(11): 1433–42. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00974-0>
- Tao K., Tzou P.L., Nouhin J., Gupta R.K., de Oliveira T., Kosakovsky Pond S.L., et al. The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants. *Nat. Rev. Genet.* 2021; 22(12): 757–73. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00408-x>
- Saito A., Irie T., Suzuki R., Maemura T., Nasser H., Uriu K., et al. Enhanced fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Delta P681R mutation. *Nature.* 2021; 602(7896): 300–6. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04266-9>
- Lu L., Mok B.W., Chen L.L., Chan J.M., Tsang O.T., Lam B.H., et al. Neutralization of SARS-CoV-2 Omicron variant by sera from BNT162b2 or Coronavac vaccine recipients. *Clin. Infect. Dis.* 2021; ciab1041. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab1041>
- Bowen J.E., Sprouse K.R., Walls A.C., Mazzitelli I.G., et al. Omicron BA.1 and BA.2 neutralizing activity elicited by a comprehensive panel of human vaccines. *bioRxiv.* 2022. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2022.03.15.484542>
- Dejnirattisai W., Huo J., Zhou D., Zahradnik J., Supasa P., Liu C., et al. Omicron-B.1.1.529 leads to widespread escape from neutralizing antibody responses. *bioRxiv.* 2021. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2021.12.03.471045>
- Wang Y., Ma Y., Xu Y., Liu J., Li X., Chen Y., et al. Resistance of SARS-CoV-2 Omicron variant to convalescent and CoronaVac vaccine plasma. *Emerg. Microbes Infect.* 2022; 11(1): 424–7. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2027219>
- Sheward D.J., Kim C., Ehling R.A., Pankow A., Dopico X.C., Martin D.P., et al. Variable loss of antibody potency against SARS-CoV-2 B.1.1.529 (Omicron). *bioRxiv.* 2021. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2021.12.19.473354>
- VanBlargan L.A., Errico J.M., Halfmann P.J., Zost S.J., Crowe J.E. Jr., Purcell L.A., et al. An infectious SARS-CoV-2 B.1.1.529 Omicron virus escapes neutralization by therapeutic monoclonal antibodies. *Nat. Med.* 2022; 28(3): 490–5. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01678-y>
- Maassab H.F., DeBorde D.C. Development and characterization of cold-adapted viruses for use as live virus vaccines. *Vaccine.* 1985; 3(5): 355–69. [https://doi.org/10.1016/0264-410x\(85\)90124-0](https://doi.org/10.1016/0264-410x(85)90124-0)
- Грачёва А.В., Корчевая Е.Р., Кудряшова А.М., Борисова О.В., Петруша О.А., Смирнова Д.И. и др. Адаптация МТТ-теста для определения нейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2021; 98(3): 253–65. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-136>
- Ramakrishnan M.A. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J. Virol.* 2016; 5(2): 85–6. <https://doi.org/10.5501/wjv.v5.i2.85>
- Chan J.F., Yip C.C., To K.K., Tang T.H., Wong S.C., Leung K.H., et al. Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/Hel real-time reverse transcription-PCR assay validated *in vitro* and with clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2020; 58(5): e00310-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00310-20>
- Reiling S.J., Chen S.H., Roy A.M., Quick J., Ragoussis I. SARS-CoV-2 McGill Nanopore sequencing protocol SuperScript IV_42C_ArticV3. Available at: <https://www.protocols.io/view/sars-cov-2-mcgill-nanopore-sequencing-protocol-sup-q26g7b25klwz/v1>
- Liu C., Mendonça L., Yang Y., Gao Y., Shen C., Liu J., et al. The architecture of inactivated SARS-CoV-2 with postfusion spikes revealed by Cryo-EM and Cryo-ET. *Structure.* 2020; 28(11): 1218–24.e4. <https://doi.org/10.1016/j.str.2020.10.001>
- Minor P.D. Live attenuated vaccines: Historical successes and current challenges. *Virology.* 2015; 479-480: 379–92. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.032>

26. Subbarao K. Live attenuated cold-adapted influenza vaccines. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2021; 11(9): a038653. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038653>
 27. Alexandrova G.I., Smorodintsev A.A. Obtaining of an additionally attenuated vaccinating cryophilic influenza strain. *Rev. Roum. Infarmacobiol.* 1965; 2(3): 179–86.
 28. Ghendon Y.Z., Polezhaev F.I., Lisovskaya K.V., Medvedeva T.E., Alexandrova G.I., Klimov A.I. Recombinant cold-adapted attenuated influenza A vaccines for use in children: molecular genetic analysis of the cold-adapted donor and recombinants. *Infect. Immun.* 1984; 44: 730–3. <https://doi.org/10.1128/IAI.44.3.730-733.1984>
 29. Maassab H.F. Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25 C. *Nature.* 1967; 213(5076): 612–4. <https://doi.org/10.1038/213612a0>
 30. Seo S.H., Jang Y. Cold-adapted live attenuated SARS-Cov-2 vaccine completely protects human ACE2 transgenic mice from SARS-CoV-2 infection. *Vaccines (Basel)*. 2020; 8(4): 584. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040584>
 31. Okamura S., Ebina H. Could live attenuated vaccines better control COVID-19? *Vaccine.* 2021; 39(39): 5719–26. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.08.018>
 32. Okamura S., Kashiwabara A., Suzuki H., Ueno S., Miyazato P., Takekawa S., et al. Live attenuated SARS-CoV-2 vaccine candidate: Protective immunity without serious lung lesions in Syrian hamsters. *bioRxiv.* 2021. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2021.02.15.430863>
- REFERENCES
1. Francis A.I., Ghany S., Gilkes T., Umakanthan S. Review of COVID-19 vaccine subtypes, efficacy and geographical distributions. *Postgrad. Med. J.* 2022; 98(1159): 389–94. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2021-140654>
 2. Marfe G., Perna S., Shukla A.K. Effectiveness of COVID-19 vaccines and their challenges (Review). *Exp. Ther. Med.* 2021; 22(6):1407. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10843>
 3. Marcelin J.R., Pettifor A., Janes H., Brown E.R., Kublin J.G., Stephenson K.E. COVID-19 vaccines and SARS-CoV-2 transmission in the era of new variants: A review and perspective. *Open Forum Infect. Dis.* 2022; 9(5): ofac124. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofac124>
 4. Kandimalla R., Chakraborty P., Vallamkondu J., Chaudhary A., Samanta S., Reddy P.H., et al. Counting on COVID-19 vaccine: insights into the current strategies, progress and future challenges. *Biomedicines.* 2021; 9(11): 1740. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111740>
 5. Kozlovskaya L.I., Piniava A.N., Ignatyev G.M., Gordeychuk I.V., Volok V.P., Rogova Y.V., et al. Long-term humoral immunogenicity, safety and protective efficacy of inactivated vaccine against COVID-19 (CoviVac) in preclinical studies. *Emerg. Microbes Infect.* 2021; 10(1): 1790–806. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1971569>
 6. Gómez-Carballa A., Pardo-Seco J., Bello X., Martín-Torres F., Salas A. Superspreading in the emergence of COVID-19 variants. *Trends Genet.* 2021; 37(12): 1069–80. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.09.003>
 7. Nikonova A.A., Faizuloev E.B., Gracheva A.V., Isakov I.Y., Zverev V.V. Genetic diversity and evolution of the biological features of the pandemic SARS-CoV-2. *Acta Naturae.* 2021; 13(3): 77–88. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11337>
 8. Choi J.Y., Smith D.M. SARS-CoV-2 variants of concern. *Yonsei Med. J.* 2021; 62(11): 961–8. <https://doi.org/10.3349/yjm.2021.62.11.961>
 9. Mathieu E., Ritchie H., Ortiz-Ospina E., Roser M., Hasell J., Appel C., et al. A global database of COVID-19 vaccinations. *Nat. Hum. Behav.* 2021; 5(7): 947–53. <https://doi.org/10.1038/s41562-021-01122-8>
 10. Dupont L., Snell L.B., Graham C., Seow J., Merrick B., Lechmere T., et al. Neutralizing antibody activity in convalescent sera from infection in humans with SARS-CoV-2 and variants of concern. *Nat. Microbiol.* 2021; 6(11): 1433–42. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00974-0>
 11. Tao K., Tzou P.L., Nouhin J., Gupta R.K., de Oliveira T., Kosakovsky Pond S.L., et al. The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants. *Nat. Rev. Genet.* 2021; 22(12): 757–73. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00408-x>
 12. Saito A., Irie T., Suzuki R., Maemura T., Nasser H., Uriu K., et al. Enhanced fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Delta P681R mutation. *Nature.* 2021; 602(7896): 300–6. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04266-9>
 13. Lu L., Mok B.W., Chen L.L., Chan J.M., Tsang O.T., Lam B.H., et al. Neutralization of SARS-CoV-2 Omicron variant by sera from BNT162b2 or Coronavac vaccine recipients. *Clin. Infect. Dis.* 2021; ciab1041. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab1041>
 14. Bowen J.E., Sprouse K.R., Walls A.C., Mazzitelli I.G., et al. Omicron BA.1 and BA.2 neutralizing activity elicited by a comprehensive panel of human vaccines. *bioRxiv.* 2022. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2022.03.15.484542>
 15. Dejnirattisai W., Huo J., Zhou D., Zahradnik J., Supasa P., Liu C., et al. Omicron-B.1.1.529 leads to widespread escape from neutralizing antibody responses. *bioRxiv.* 2021. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2021.12.03.471045>
 16. Wang Y., Ma Y., Xu Y., Liu J., Li X., Chen Y., et al. Resistance of SARS-CoV-2 Omicron variant to convalescent and CoronaVac vaccine plasma. *Emerg. Microbes Infect.* 2022; 11(1): 424–7. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2027219>
 17. Sheward D.J., Kim C., Ehling R.A., Pankow A., Dopico X.C., Martin D.P., et al. Variable loss of antibody potency against SARS-CoV-2 B.1.1.529 (Omicron). *bioRxiv.* 2021. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2021.12.19.473354>
 18. VanBlargan L.A., Errico J.M., Halfmann P.J., Zost S.J., Crowe J.E. Jr., Purcell L.A., et al. An infectious SARS-CoV-2 B.1.1.529 Omicron virus escapes neutralization by therapeutic monoclonal antibodies. *Nat. Med.* 2022; 28(3): 490–5. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01678-y>
 19. Maassab H.F., DeBorde D.C. Development and characterization of cold-adapted viruses for use as live virus vaccines. *Vaccine.* 1985; 3(5): 355–69. [https://doi.org/10.1016/0264-410x\(85\)90124-0](https://doi.org/10.1016/0264-410x(85)90124-0)
 20. Gracheva A.V., Korchevaya E.R., Kudryashova A.M., Borisova O.V., Petrusheva O.A., Smirnova D.I., et al. Adaptation of the MTT assay for detection of neutralizing antibodies against the SARS-CoV-2 virus. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2021; 98(3): 253–65. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-136>
 21. Ramakrishnan M.A. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J. Virol.* 2016; 5(2): 85–6. <https://doi.org/10.5501/wjv.v5.i2.85>
 22. Chan J.F., Yip C.C., To K.K., Tang T.H., Wong S.C., Leung K.H., et al. Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/Hel real-time reverse transcription-PCR assay validated *in vitro* and with clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2020; 58(5): e00310-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00310-20>
 23. Reiling S.J., Chen S.H., Roy A.M., Quick J., Ragoussis I. SARS-CoV-2 McGill Nanopore sequencing protocol SuperScript IV_42C_ArticV3. Available at: <https://www.protocols.io/view/sars-cov-2-mcgill-nanopore-sequencing-protocol-suppq26g7b25klwz/v1>
 24. Liu C., Mendonça L., Yang Y., Gao Y., Shen C., Liu J., et al. The architecture of inactivated SARS-CoV-2 with postfusion spikes revealed by Cryo-EM and Cryo-ET. *Structure.* 2020; 28(11): 1218–24.e4. <https://doi.org/10.1016/j.str.2020.10.001>
 25. Minor P.D. Live attenuated vaccines: Historical successes and current challenges. *Virology.* 2015; 479-480: 379–92. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.032>

26. Subbarao K. Live attenuated cold-adapted influenza vaccines. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2021; 11(9): a038653. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038653>
27. Alexandrova G.I., Smorodintsev A.A. Obtaining of an additionally attenuated vaccinating cryophilic influenza strain. *Rev. Roum. Inframicrobiol.* 1965; 2(3): 179–86.
28. Ghendon Y.Z., Polezhaev F.I., Lisovskaya K.V., Medvedeva T.E., Alexandrova G.I., Klimov A.I. Recombinant cold-adapted attenuated influenza A vaccines for use in children: molecular genetic analysis of the cold-adapted donor and recombinants. *Infect. Immun.* 1984; 44: 730–3. <https://doi.org/10.1128/IAI.44.3.730-733.1984>
29. Maassab H.F. Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25 C. *Nature.* 1967; 213(5076): 612–4. <https://doi.org/10.1038/213612a0>

Информация об авторах

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

Корчевая Екатерина Романовна — м.н.с., лаб. молекулярной вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6417-3301>

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

Самойликов Роман Владимирович — м.н.с., лаб. молекулярной иммунологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6405-1390>

Смирнова Дарья Ильинична — м.н.с., лаб. молекулярной вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7325-0834>

Соколова Ольга Сергеевна — д.б.н., профессор кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4678-232X>

Глухов Григорий Сергеевич — к.б.н., доцент кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9540-8249>

Моисеев Андрей Владимирович — ведущий инженер лаб. электронной микроскопии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1112-2356>

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

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

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

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

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

Статья поступила в редакцию 19.05.2022;
принята к публикации 20.07.2022;
опубликована 30.08.2022

30. Seo S.H., Jang Y. Cold-adapted live attenuated SARS-CoV-2 vaccine completely protects human ACE2 transgenic mice from SARS-Cov-2 infection. *Vaccines (Basel)*. 2020; 8(4): 584. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040584>
31. Okamura S., Ebina H. Could live attenuated vaccines better control COVID-19? *Vaccine*. 2021; 39(39): 5719–26. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.08.018>
32. Okamura S., Kashiwabara A., Suzuki H., Ueno S., Miyazato P., Takekawa S., et al. Live attenuated SARS-CoV-2 vaccine candidate: Protective immunity without serious lung lesions in Syrian hamsters. *bioRxiv*. 2021. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2021.02.15.430863>

Information about the authors

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

Ekaterina R. Korchevaya — junior researcher, Laboratory of molecular virology, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6417-3301>

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

Roman V. Samoilkov — junior researcher, Laboratory of molecular virology, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6405-1390>

Daria I. Smirnova — junior researcher, Laboratory of molecular virology, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7325-0834>

Olga S. Sokolova — D. Sci. (Biol.), Professor, Bioengineering department, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4678-232X>

Grigory S. Glukhov — Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Bioengineering department, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9540-8249>

Andrey V. Moiseenko — leading engineer, Laboratory of electron microscopy, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1112-2356>

Irina A. Leneva — D. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of experimental virology, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7755-2714>

Firaya G. Nagieva — D. Sci. (Med.), Associate Professor, Head, Laboratory of hybrid cell cultures, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8204-4899>

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

Vitaly V. Zverev — D. Sci. (Biol.), Professor, Academician of RAS, Scientific director, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5808-2246>

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

The article was submitted 19.05.2022;
accepted for publication 20.07.2022;
published 30.08.2022

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-195>

Особенности распространения новой коронавирусной инфекции на территории муниципальных образований Ростовской области

Соболева Е.Г.^{1✉}, Ковалев Е.В.², Слись С.С.², Пичурина Н.Л.¹, Кононенко А.А.¹, Сокиркина Е.Н.¹, Носков А.К.¹

¹Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт, Ростов-на-Дону, Россия;

²Управление Роспотребнадзора по Ростовской области, Ростов-на-Дону, Россия

Аннотация

Введение. С момента регистрации первых случаев COVID-19 вследствие высокой миграционной активности населения новая коронавирусная инфекция получила пандемическое распространение по всему миру, включая Россию.

Цель работы — установить особенности распространения новой коронавирусной инфекции на территории Ростовской области.

Материалы и методы. На основании анонимизированных данных Управления Роспотребнадзора по Ростовской области проведен анализ 81 случая завоза новой коронавирусной инфекции лицами, прибывшими в Ростовскую область из-за рубежа или других субъектов РФ. Изучена динамика распространения COVID-19 по административным территориям Ростовской области. В работе использованы данные результатов полногеномного секвенирования ($n = 155$), проведенного на базе Ростовского-на-Дону противочумного института.

Результаты. В период с 21.03.2020 по 28.03.2020 в Ростовской области зарегистрированы завозные случаи как из-за рубежа, так и из других субъектов РФ, преимущественно на территории Ростовской городской агломерации. Вектор распространения болезни направлен от административного центра области к периферии. Появление новой генетической линии B.617.2 (Delta), вероятно, привело к значительному росту заболеваемости на территории Ростовской области.

Выводы. Распространению новой коронавирусной инфекции в Ростовской области способствовала реализация одного из основных социальных факторов эпидемиологического риска — миграция населения, что привело к завозу инфекции в административный центр субъекта — Ростов-на-Дону. С учётом ряда особенностей Ростовской области, наибольшая доля заболевших COVID-19 зафиксирована в Ростовской городской агломерации. На фоне доминирования геноварианта Delta на территории Ростовской области отмечалась тенденция к росту числа заболевших.

Ключевые слова: новая коронавирусная инфекция, COVID-19, завоз, распространение, заболеваемость, Ростовская область

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

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

Для цитирования: Соболева Е.Г., Ковалев Е.В., Слись С.С., Пичурина Н.Л., Кононенко А.А., Сокиркина Е.Н., Носков А.К. Особенности распространения новой коронавирусной инфекции на территории муниципальных образований Ростовской области. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(4):410–419. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-195>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-195>

Features of the spread of a new coronavirus infection in the territory of municipalities of the Rostov region

Evgeniya G. Soboleva^{1✉}, Evgenij V. Kovalev², Sergej S. Slis², Natalia L. Pichurina¹, Anna A. Kononenko¹, Elena N. Sokirkina¹, Alexey K. Noskov¹

¹Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russia;

²Department of the Federal Service for Supervision of Consumer Protection and Human Welfare in the Rostov Region, Rostov-on-Don, Russia

Abstract

Introduction. Since the registration of the first cases of COVID-19 in the PRC, due to the high migration activity of the population, the new coronavirus infection has spread throughout the world, including the Russian Federation.

Aim. To establish the features of the spread of a new coronavirus infection in the Rostov Region.

Materials and methods. The analysis of 81 cases of the importation of a new coronavirus infection by persons who arrived in the Rostov Region from abroad or other regions of the Russian Federation was carried out based on the data of the Rostov Region office of the Federal Service for Supervision of Consumer Protection and Human Welfare. The dynamics of the spread of COVID-19 in the administrative territories of the Rostov Region has been analyzed. The data of viral genome-wide sequencing ($n = 155$) carried out in the Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute were used in this study.

Results. In the period from 03/21/2020 to 03/28/2020, cases imported both from abroad and from other regions of the Russian Federation were registered in the Rostov Region, , mainly on the territory of the Rostov urban agglomeration. The vector of the spread of the disease was directed from the administrative center of the region to the periphery. The emergence of a new genetic line B.617.2 (Delta) probably led to a significant increase in the incidence in the Rostov Region.

Conclusions. The spread of a new coronavirus infection in the Rostov Region was facilitated by the one of the main social factors of epidemiological risk, the population migration, which led to the importation of the infection to the administrative center of the subject, Rostov-on-Don city. Taking into account peculiarities of the Rostov region, the largest proportion of COVID-19 cases was recorded in the Rostov urban agglomeration. Against the background of the dominance of the "Delta" variant of the virus on the territory of the Rostov region, there was a tendency towards an increase in the number of cases.

Keywords: *new coronavirus infection, COVID-19, importation, spread, morbidity, Rostov region*

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

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

For citation: Soboleva E.G., Kovalev E.V., Slis S.S., Pichurina N.L., Kononenko A.A., Sokirina E.N., Noskov A.K. Features of the spread of a new coronavirus infection in the territory of municipalities of the Rostov region. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(4):410–419. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-195>

Введение

С момента регистрации первых больных COVID-19 стало очевидным, что вследствие высокой частоты перемещения заболевших, находящихся в инкубационном периоде, новая коронавирусная инфекция получила пандемическое распространение. Миграция играет важную роль в развитии эпидемического процесса COVID-19. Высокие темпы распространения пандемии способствовали практически моментальной остановке гражданских перевозок. Однако многие страны организовывали специальные авиарейсы для возвращения граждан, находившихся за рубежом в момент закрытия границ, что впоследствии привело к завозу инфекции на территории, где ранее COVID-19 не регистрировали [1].

Первые завозы SARS-CoV-2 на территорию России осуществлены гражданами Китайской Народной Республики, прибывшими в Забайкальский край и Тюменскую область. В марте 2020 г. зарегистрирован первый в стране случай заболевания, не связанный с завозом из других территорий¹. Непосредственно в Ростовскую область (РО) COVID-19 был завезён 21.03.2020 из Королевства Таиланд.

РО находится на 5-м месте в России по числу заболевших. На 04.08.2021 в области зарегистрировано 111 386 подтверждённых случаев COVID-19².

Распространение возбудителя COVID-19 осуществляется аэрозольным механизмом передачи с преимущественно воздушно-капельным, а также контактным путём. Риск реализации путей распространения SARS-CoV-2 повышается в условиях несоблюдения требований санитарно-противоэпидемического режима и правил эпидемиологической безопасности³.

Увеличению интенсивности заболеваемости и скорости распространения COVID-19, кроме прочих факторов, способствуют генетические мутации возбудителя. Данные о геноварианте SARS-CoV-2 VOC 20212/01 (линия B.1.1.7, или Alfa) представлены в декабре 2020 г. властями Великобритании и Северной Ирландии во Всемирную организацию здравоохранения. Новая линия B.1.1.7 превзошла суще-

¹ Российская газета. Коронавирус. Хроника распространения. URL: <https://rg.ru/2020/03/03/koronavirus-hronika-rasprostraneniya.html> (дата обращения 11.05.2021).

² Коронавирус-монитор. Статистика распространения коронавируса в Ростовской области. URL: <https://coronavirus-monitor.info/country/russia/rostovskaya-oblast> (дата обращения 11.05.2021).

³ Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)». URL: https://xn--80aesfpebagmflc0a.xn--plai/ai/doc/872/attach/Bmr_COVID-19_compressed.pdf (дата обращения 11.05.2021).

ствовавшую популяцию циркулирующих вариантов и стремительно распространилась по территории государства и за его пределы⁴. Новый мутировавший геновариант коронавируса обладает повышенной способностью передаваться от человека к человеку и обуславливает более тяжёлое течение болезни [2, 3]. Кроме того, в октябре 2020 г. в Индии впервые выявлен геновариант В.617.2. SARS-CoV-2 (Delta) [4, 5]. Указанный геновариант вызвал резкое увеличение числа случаев заболевания в этой стране и в настоящее время доминирует по всему миру⁵.

Цель работы — установить особенности распространения COVID-19 на территории РО.

Материалы и методы

На основании анонимизированных данных Управления Роспотребнадзора по РО проведён анализ 81 случая завоза COVID-19 лицами, прибывшими в РО из-за рубежа или из других субъектов РФ. Изучена динамика распространения COVID-19 по административным территориям РО. В работе использованы данные результатов полногеномного секвенирования ($n = 155$), осуществлённого на базе Ростовского-на-Дону противочумного института. Статистическая обработка данных проведена общепринятым методом.

Результаты

При рассмотрении распространения COVID-19 по муниципальным образованиям РО с момента регистрации первого больного, установлено, что с 21.03.2020 по 28.03.2020 зарегистрированы 4 завозных случая в Ростов-на-Дону и 1 — в Азов. Завозы осуществлены из стран Азии (Королевство Таиланд — 2, Объединённые Арабские Эмираты — 1) и Европы (Швейцарская Конфедерация и Франция — по 1 случаю) (рис. 1, а).

Завозы из-за рубежа выявлены с 29.03.2020 по 04.04.2020 — 1 случай из Королевства Таиланд в Семикаракорский район РО. Двое больных прибыли из других субъектов РФ в Аксайский и Кашарский районы области. Тогда же зарегистрированы первые случаи местной передачи инфекции в г. Ростов-на-Дону (рис. 1, б).

В период с 05.04.2020 по 11.04.2020 отмечено 7 завозных случаев из-за пределов РФ в Ро-

стов-на-Дону (4 случая) и Мартыновский район РО (3 случая) из Королевства Таиланд и Франции; 10 завозов из других территорий РФ в Донецк, Зверево, Батайск, Новочеркасск, Матвеево-Курганский, Аксайский, Цимлянский и Октябрьский районы из Москвы и Московской области (7 случаев), а также из Калужской, Нижегородской областей и Республики Башкортостан (по 1 случаю соответственно). Кроме того, в этот период зарегистрированы 23 случая местного заражения (рис. 1, в).

За неделю с 12.04.2020 по 18.04.2020 территориальный охват заболеваемости значительно увеличился. Необходимо отметить, что в указанный недельный период в РО преобладали местные случаи инфицирования (136 случаев). При этом наибольший удельный вес больных зарегистрирован в Ростове-на-Дону и прилегающих к нему муниципальных образованиях, составляющих Ростовскую городскую агломерацию [6] — 98 (72,1%) больных. Завозы COVID-19 в основном осуществлялись из других субъектов РФ — 35 (89,7%) случаев, преимущественно из Москвы и Московской области, а также из Санкт-Петербурга, Республики Крым (Ялта) и Калужской области. Кроме того, зарегистрировано по 1 случаю завоза COVID-19 в Ростов-на-Дону из КНР, Грузии, Великобритании и Германии.

В связи с высокими темпами распространения COVID-19 в период с 13.04.2021 по 18.04.2021 отмечалось нивелирование значения завозных случаев в распространении новой коронавирусной инфекции на территории РО (рис. 2).

Изучение динамики числа заболевших в РО позволило установить, что в период с 09.01.2021 по 15.01.2021 зарегистрировано 2747 больных ($65,4 \pm 1,25$ на 100 тыс. населения), что являлось максимальным значением на дату проведения данного исследования. Заболеваемость в данный период была обусловлена циркуляцией вируса SARS-CoV-2, отнесённого к генетической линии В.1.1. Дифференциация территории РО по числу заболевших позволила выделить муниципальные образования с очень высоким (≥ 60 случаев COVID-19), высоким (40–59 случаев), средним (11–39 случаев) и низким (0–10 случаев) уровнями заболеваемости. В Ростовской городской агломерации к условной группе территорий с очень высоким уровнем заболеваемости отнесены города Шахты, Таганрог, Новошахтинск, Батайск, Ростов-на-Дону, высоким — Новочеркасск, Неклиновский и Азовский районы и средним — Азов. Среди не вошедших в Ростовскую городскую агломерацию муниципальные образования распределились по уровню заболеваемости следующим образом: очень высокий — Миллеровский район, высокий — города Волгодонск и Гуково, Чертковский, Верхнедонской, Куйбышевский, Белокалитвинский, Красносулинский, Сальский

⁴ WHO. COVID-19 — United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland; 2020. URL: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2020-DON304> (дата обращения 11.05.2021).

⁵ ВОЗ. Отслеживание вариантов вируса SARS-CoV-2; 2021. URL: <https://www.who.int/ru/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/tracking-SARS-CoV-2-variants> (дата обращения 11.05.2021); Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Дюжина вопросов о «дельта»-штамме; 2021. URL: https://www.rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=18610 (дата обращения 11.05.2021).

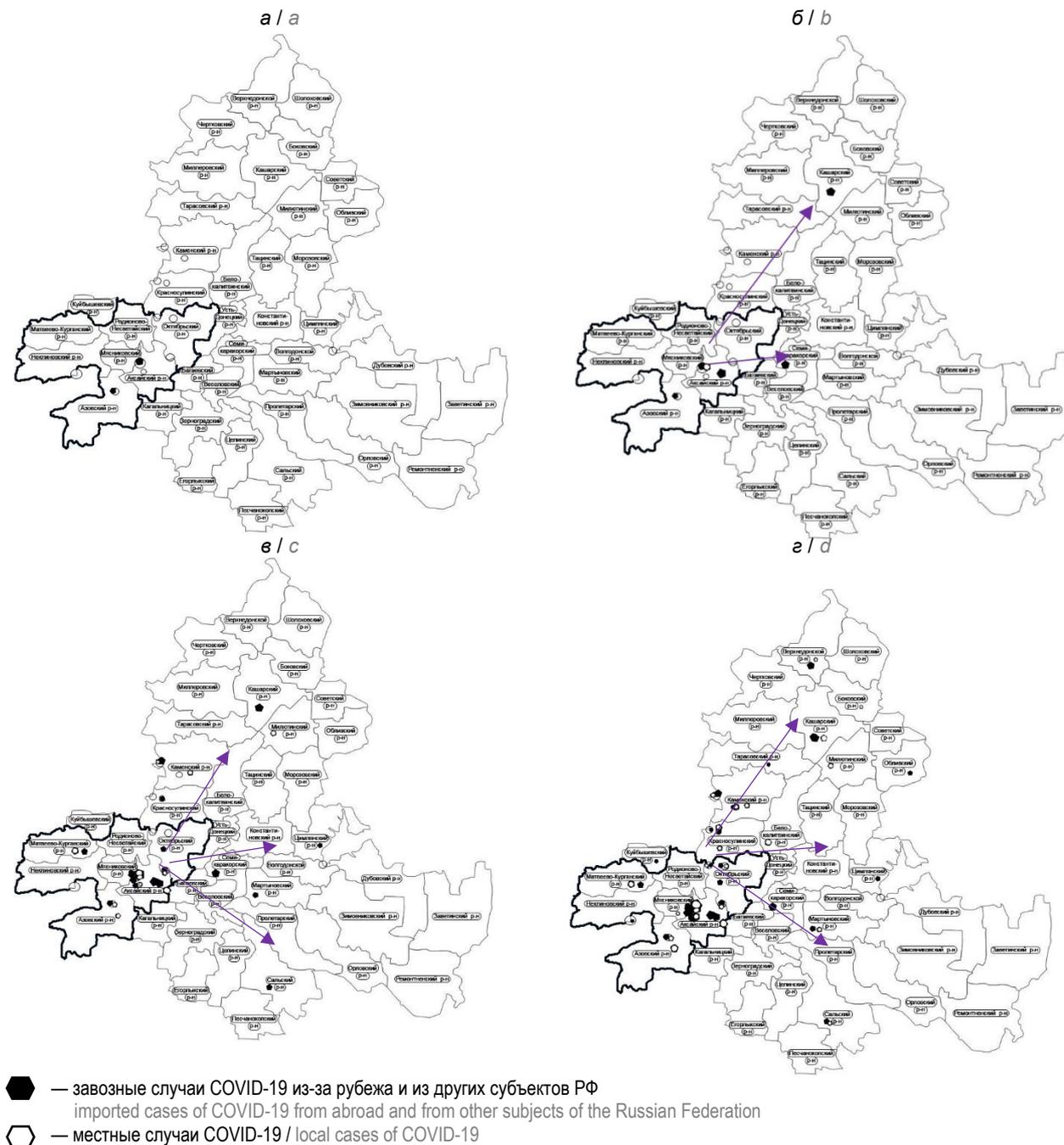


Рис. 1. Завозные и местные случаи COVID-19 в РО в периоды: 21.03.2020–28.03.2020 (а), 29.03.2020–04.04.2020 (б), 05.04.2020–11.04.2020 (в), 12.04.2020–18.04.2020 (г).

Fig. 1. Imported and local cases of COVID-19 in Rostov Region in the periods: 21.03.2020 to 28.03.2020 (a), 29.03.2020 to 05.04.2020 (b), 06.04.2020 to 12.04.2020 (c), 13.04.2020 to 18.04.2020 (d).

районы; средний — 28 районов, города Донецк и Каменск-Шахтинский, низкий — 6 районов и г. Звереве (рис. 3, а).

В период 20.05.2021–26.05.2021 отмечалось значительное снижение количества заболевших в ряде муниципальных районов области. Всего за этот период зарегистрировано 1356 больных ($32,27 \pm 0,88$ на 100 тыс. населения), при этом 60,7% случаев

заболевания людей приходилось на районы и города, отнесённые к Ростовской городской агломерации. В группу муниципальных образований с очень высоким числом больных вошёл Ростов-на-Дону, высоким — города Новочеркасск, Батайск, Таганрог, средним — города Шахты, Азов, Новошахтинск, Неклиновский, Мясниковский, Азовский, Аксайский районы и низким — Октябрьский,

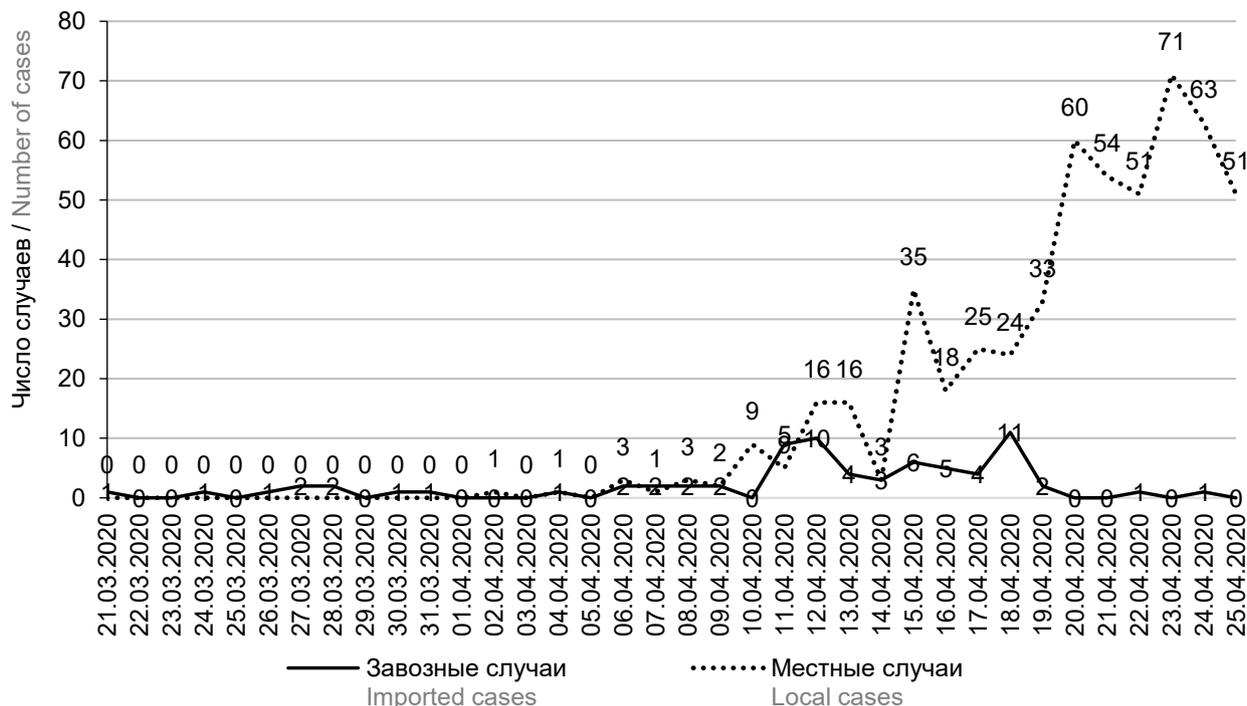


Рис. 2. Число завозных и местных случаев новой коронавирусной инфекции в РО.

Fig. 2. The number of imported and local cases of new coronavirus infection in Rostov Region.

Матвеево-Курганский и Родионово-Несветайский районы (рис. 3, б).

Первый случай заболевания с идентификацией геноварианта Alfa в РО зафиксирован в г. Шахты 05.03.2021 (дата заболевания 20.02.2021), геноварианта Delta — 28.05.2021 в г. Каменск-Шахтинский (дата заболевания 24.05.2021). В результате биоинформационного анализа данных проведённого полногеномного секвенирования возбудителя COVID-19 в Ростовской области установлено, что геновариант B.1.1.7 SARS-CoV-2 выделялся по 31.05.2021–06.06.2021 включительно, тогда как геновариант B.617.2 был изолирован с 24.05.2021–30.05.2021 до момента написания статьи (04.06.2021). В связи с более высокой контагиозностью геноварианта Delta по сравнению с Alfa, на территории РО произошла смена доминирующего геноварианта.

Всего на 07.07.2021 с помощью метода полногеномного секвенирования исследовано 155 проб из 32 муниципальных образований РО, из них в 27 (17,4%) пробах возбудитель идентифицирован как геновариант B.1.1.7 (рис. 4, а), в 50 (32,3%) — как B.617.2 (рис. 4, б).

Обсуждение

Одним из основных факторов распространения инфекционных болезней, в том числе COVID-19, является миграция населения. Также немаловажное значение имеет рост доли городского населения [6].

Анализ данных о распространении COVID-19 в РО показал, что наибольшее число завозов как из-за рубежа, так и из других субъектов РФ зарегистрировано на территории Ростовской городской агломерации. Удельный вес завозов на территории Ростовской городской агломерации составляет 59,2% (42 случая) (ошибка репрезентативности $\pm 11,4\%$), из них 50% — в Ростове-на-Дону. Из общего числа завозных случаев (21), зарегистрированных в административном центре области, 14 наблюдались среди прибывших из зарубежных стран. Количество завозов на другие территории агломерации из различных субъектов РФ (27 случаев) составило 38% от общего по РО. Указанное, вероятно, обусловлено наличием вблизи Ростова-на-Дону международного воздушного пункта пропуска через государственную границу РФ (аэропорт Платов), узловой железнодорожной станции Ростовского региона Северо-Кавказской железной дороги, а также трудовой миграцией на территории агломерации.

Доля завозов в муниципальные образования, не входящие в Ростовскую городскую агломерацию, — 40,8% (29 случаев; ошибка репрезентативности $\pm 11,3\%$), из них 37,9% (11 случаев) — в города области. За исследуемый период зарегистрировано 86,2% завозов (25 случаев) из других регионов РФ, что, предположительно, связано с прохождением на территории области автомагистралей, в том числе Федеральной автомобильной дороги М4 «Дон», грузовых и пассажирских потоков на автомобильном и железнодорожном транспорте федерального

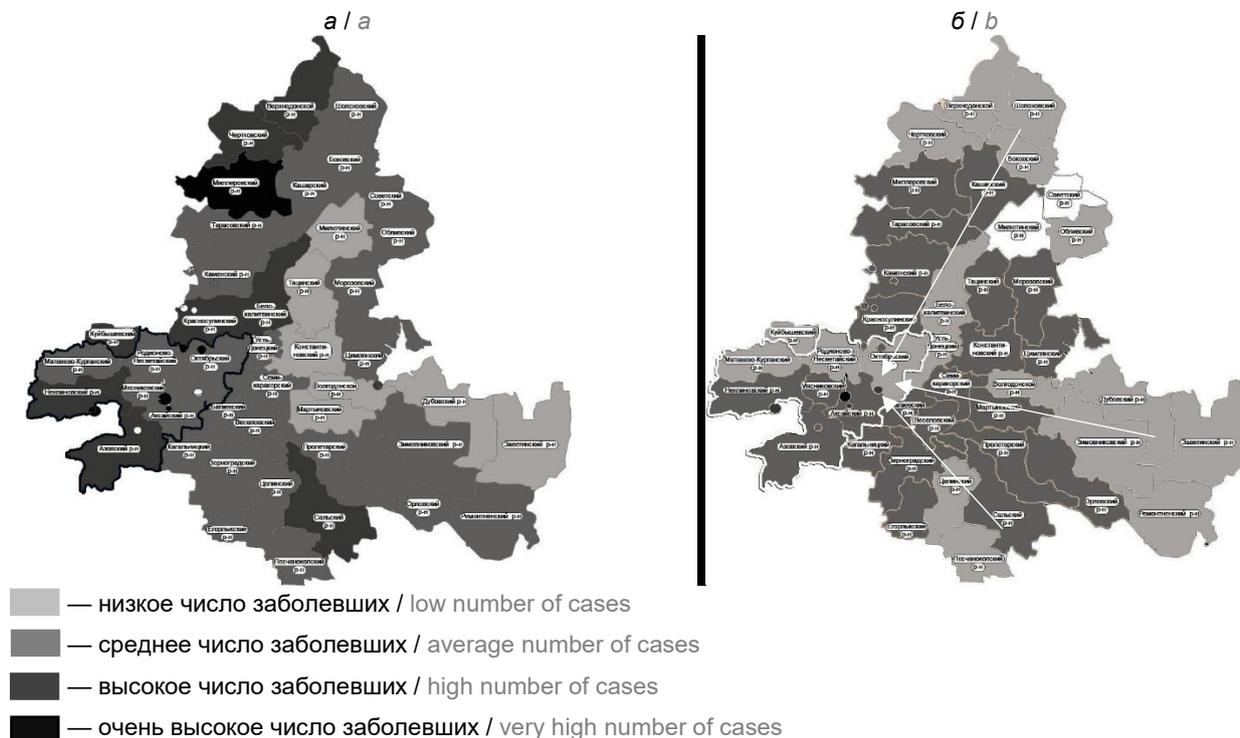


Рис. 3. Число больных COVID-19 в муниципальных образованиях Ростовской области на период с максимальным числом больных — 09.01.2021–15.01.2021 (а) и на дату написания статьи — 20.05.2021–26.05.2021 (б).

Fig. 3. The number of patients with COVID-19 in the municipalities of the Rostov Region during the period with the maximum number of patients — 09.01.2021 to 15.01.2021 (a) and as of the period of the preparation of the manuscript — 20.05.2021 to 26.05.2021 (b).

и регионального значения, обуславливающих в указанной группе муниципальных образований интенсивную миграцию населения.

Аналогична ситуация, сложившейся в РО, обстановка в КНР. Масштабная и интенсивная миграция в канун Праздника весны («Чунъюнь») способствовала ускорению распространения болезни, о чём свидетельствует анализ данных пассажирских перевозок на транспорте [7].

При оценке эпидемических проявлений COVID-19 в первые 4 нед (2 инкубационных периода) установлено, что вектор распространения инфекции направлен от административного центра области к периферии (рис. 1), что, вероятно, обусловлено непрерывностью работы ряда организаций, в том числе промышленных предприятий, на территории Ростовской городской агломерации и других муниципальных образований области в период проведения ограничительных мероприятий^{6, 7}

⁶ Постановление № 272 «О мерах по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения на территории Ростовской области в связи с распространением новой коронавирусной инфекции (COVID-19)».

⁷ Указ Президента Российской Федерации от 02.04.2020 № 239 «О мерах по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения на территории Российской Федерации в связи с распространением новой коронавирусной инфекции COVID-19».

и, соответственно, сохранения интенсивной маятниковой миграции населения. Однако распространение COVID-19 в кластере муниципальных образований области, не входящих в Ростовскую городскую агломерацию, менее выражено в связи с преобладанием сельскохозяйственного отраслевого направления деятельности населения [8].

Проведённый анализ территориального распространения COVID-19 в Омской области показал, что наибольшее количество заболевших пришлось на столицу субъекта — Омск и близрасположенные районы [9]. Это схоже с картиной в РО.

В работе В.Г. Акимкина и соавт. рассмотрено распространение COVID-19 в 2020 г. в условиях мегаполиса [10]. Получены аналогичные выводы — сохранение непрерывности работы ряда организаций, обеспечивающих необходимый уровень жизнедеятельности города, привело к интенсификации эпидемического процесса.

В период 09.01.2021–15.01.2021 наибольший удельный вес больных (59,5%) пришёлся на Ростовскую городскую агломерацию. Муниципальные образования агломерации отнесены к условным группам территорий с очень высоким (≥ 60 человек), высоким (40–59) и средним (11–39) числом больных. Подобная ситуация, предположительно, обусловлена активным перемешиванием различных контингентов вследствие множествен-

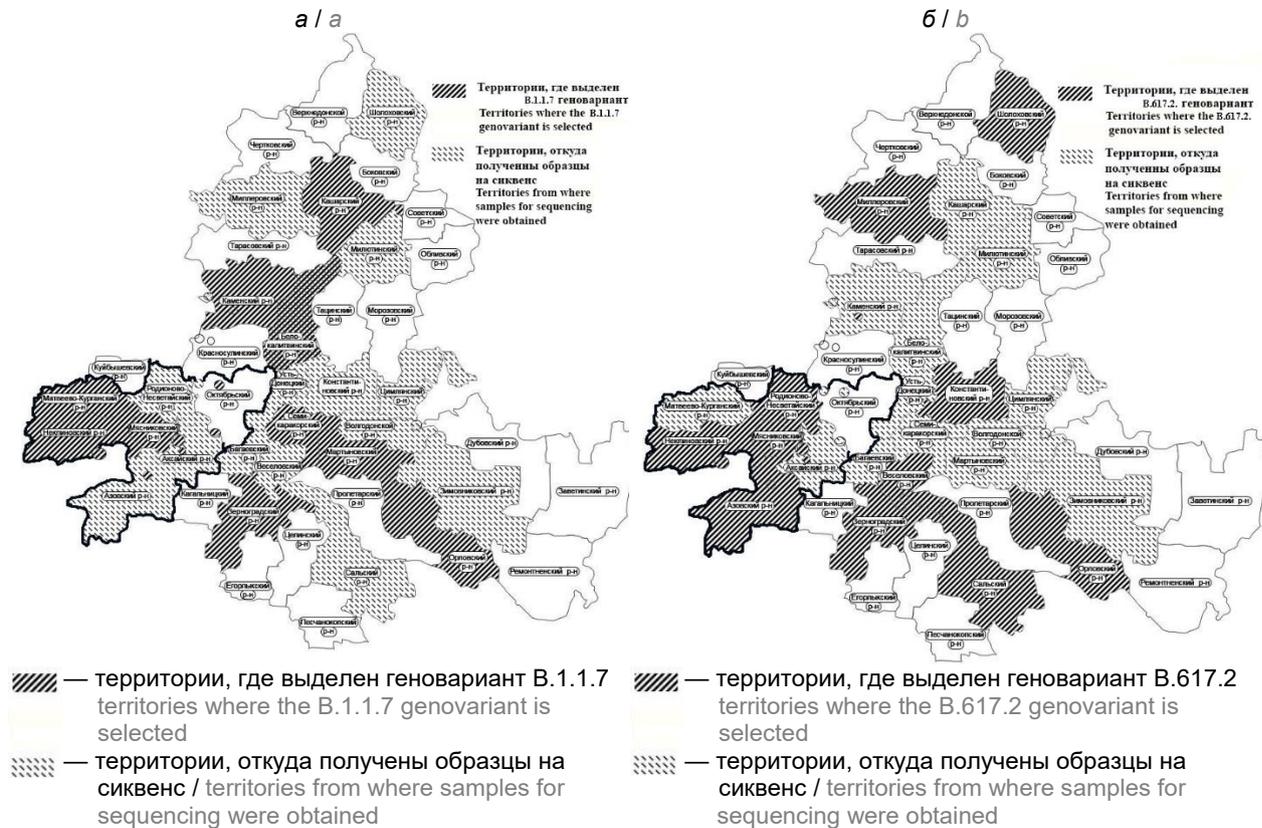


Рис. 4. Муниципальные районы РО с подтверждёнными случаями заражения геновариантами B.1.1.7 (а) и B.617.2 (б) COVID-19 в 2021 г.

Fig. 4. Municipal districts of the Rostov Region with confirmed cases of infection with genetic variants B.1.1.7 (a) and B.617.2 (b) COVID-19 in 2021.

ных и разнообразных контактов населения в новогодние праздники.

При рассмотрении заболеваемости в период 20.05.2021–26.05.2021 очевидно, что вектор распространения COVID-19 в РО изменил направление — от периферии к административному центру субъекта. Подобная картина, предположительно, обусловлена рядом особенностей субъекта. РО отличается существенной пространственной дифференциацией социально-экономического развития, включая территории экономической активности — Ростовскую городскую агломерацию с городом-миллионером, что приводит к трудовой маятниковой миграции из муниципальных районов, прилегающих к ядру Ростовской городской агломерации, и прочие типичные периферийные районы с преимущественно аграрным характером хозяйства, слабой транспортной доступностью и отсутствием на большей части территории городского населения [11]. Вышесказанное обуславливает большее количество контактов в организованных трудовых коллективах и общественном транспорте населения в Ростовской городской агломерации, что, соответственно, приводит к большому числу заболевших на указанных территориях.

Эпидемиологическая ситуация в РО имеет ряд особенностей. Так, число завозных случаев с 03.05.2021 по 30.05.2021 (2 инкубационных периода) превышает таковое на начало эпидемических проявлений на территории РО (таблица). В указанный период зарегистрировано 17 случаев завоза из стран, преимущественно туристических направлений. Вероятно, эта ситуация обусловлена возобновлением международных транспортных сообщений между Российской Федерацией и рядом зарубежных государств⁸ с трудовой, туристической и образовательной⁹, ¹⁰ целями, а также с началом сезона отпусков.

Влияние на эпидемиологическую ситуацию, несомненно, оказывают геномные изменения возбудителя. Мутантный вариант SARS-CoV-2 Alfa,

⁸ Правительство РФ. Правительство возобновляет авиасообщение России с Германией, Венесуэлой, Сирией, Таджикистаном, Узбекистаном и Шри-Ланкой; 2021. URL: <http://government.ru/news/41820>

⁹ Распоряжение Правительства Российской Федерации от 16.03.2021 № 639-р.

¹⁰ Распоряжение Правительства Российской Федерации от 31.03.2021 № 814-р.

Число завозных случаев на территорию Ростовской области в период 03.05.2021–30.05.2021

The number of imported cases into the territory of the Rostov Region in the period 03.05.2021–30.05.2021

Страна Country	Число завозных случаев Number of imported cases
Объединённые Арабские Эмираты United Arab Emirates	5
Республика Куба Republic of Cuba	3
Арабская Республика Египет Arab Republic of Egypt	3
Республика Сейшельские Острова Republic of Seychelles	2
Мальдивская Республика Maldives	1
Германия (Франкфурт-на-Майне) Germany (Frankfurt am Main)	1
Республика Словения Republic of Slovenia	1
Республика Узбекистан Republic of Uzbekistan	1

обладающий более высокой контагиозностью по сравнению с вариантом, идентифицированным в Ухане, привёл к увеличению скорости распространения вируса в популяции человека в ряде стран. Это коснулось и РО.

Сравнение полученных данных с результатами биоинформационного анализа полногеномного секвенирования в Москве и Московской области

показало, что аналогичная ситуация наблюдалась и там, но в более ранние сроки. Указанное свидетельствует о том, что вектор распространения направлен от столицы к периферийным регионам [12].

На фоне указанных особенностей геноварианта Alfa сохранялась общая тенденция к снижению и стабилизации эпидемиологической ситуации в РО с темпом снижения заболеваемости –67,4% на 26.05.2021. Однако появление на территории РО варианта SARS-CoV-2 Delta и начало сезона отпусков привело к значительному росту заболеваемости с темпом прироста 28,2% в связи с выездами населения в курортных направлениях на территории России, а также в зарубежные страны (рис. 5).

Выводы

Широкому территориальному распространению COVID-19 как заболевания с преимущественно лёгочным синдромом в РО способствовала реализация одного из основных социальных факторов эпидемиологического риска — миграции населения [13], что привело к завозу инфекции в административный центр РО — Ростов-на-Дону. В связи с расположением на территории субъекта пункта пропуска через государственную границу Российской Федерации — аэропорта Платов и прохождения Федеральной автомобильной дороги М4 «Дон» — наибольший удельный вес завозов как из-за рубежа, так и из других регионов РФ пришелся на территории Ростовской городской агломерации. В последующем вектор распространения инфекции был

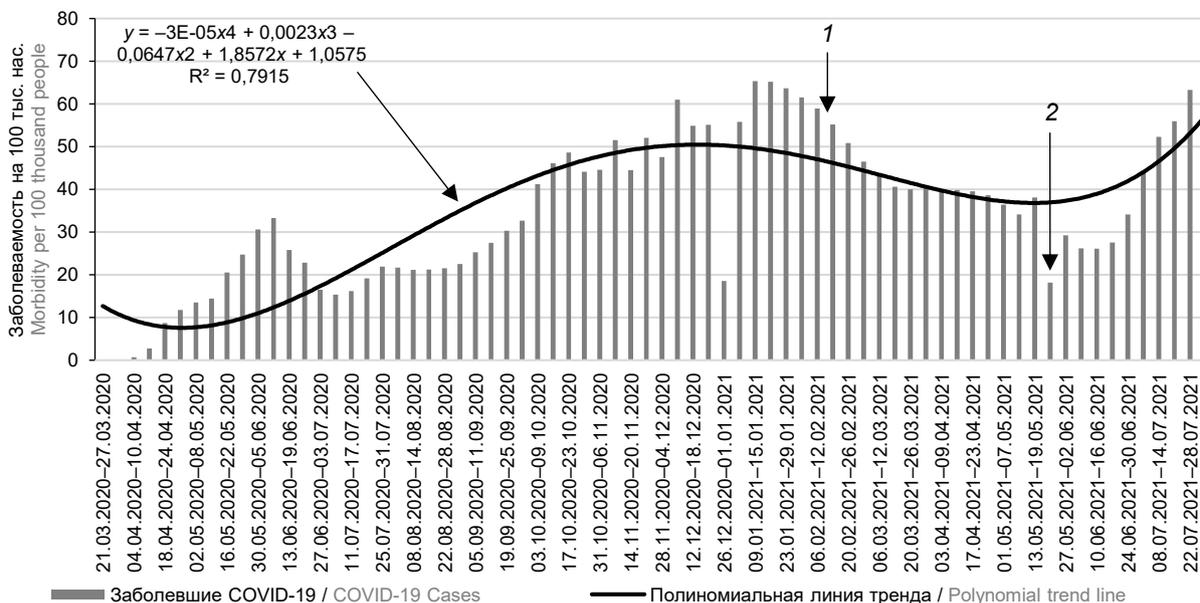


Рис. 5. Заболеваемость COVID-19 в РО в 2020–2021 гг.

- 1 — первый случай выделения от больного геноварианта В.1.1.7 COVID-19;
- 2 — первый случай выделения от больного геноварианта В.617.2 COVID-19.

Fig. 5. The incidence of new coronavirus infection COVID-19 in the Rostov Region in 2020–2021.

- 1 — the first case of isolation of "British" genetic variant of SARS-CoV-2;
- 2 — the first case of isolation of "Indian" genetic variant of SARS-CoV-2.

направлен от Ростовской городской агломерации к периферии области.

С учетом ряда особенностей РО, наибольшая доля заболевших COVID-19 зафиксирована в Ростовской городской агломерации. Введение ограничительных мероприятий на начальных этапах эпидемических проявлений COVID-19 в Российской Федерации и в РО в частности, закрытие границ с зарубежными государствами привело к увеличению числа завозных случаев из других субъектов России.

Число завозных случаев на 04.08.2021 превышает таковое на начало эпидемических проявлений на территории РО, что, вероятно, связано с возобновлением международных транспортных сообщений со странами преимущественно туристических направлений. На фоне выявления геноварианта Alfa на территории РО отмечалась тенденция к снижению и стабилизации эпидемиологической ситуации. Однако появление мутантного геноварианта Delta на территории РО привело к росту числа заболевших. В ответ на сложившуюся ситуацию на территории РО был введен ряд ограничительных мероприятий¹¹. На основании проведенного анализа можно сделать вывод, что при сохранении текущей ситуации и свойств вируса и при несоблюдении введенных ограничительных мероприятий наметившаяся тенденция может сохраниться, что осложнит эпидемиологическую ситуацию в РО.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Малахов В.С., Мотин А.С. Влияние пандемии COVID-19 на миграционные процессы и миграционную политику в Европейском союзе и в России. *Мониторинг экономической ситуации в России: тенденции и вызовы социально-экономического развития*. 2020; (17): 31–42.
2. Кононенко А.А., Носков А.К., Водяницкая С.Ю., Подойнищина О.А. Коронавирусы человека, способные вызывать чрезвычайные ситуации. *Медицинский вестник Юга России*. 2021; 12(1): 14–23. <https://doi.org/10.21886/2219-8075-2021-12-1-14-23>
3. Капуста А.А. Молекулярно-генетические особенности коронавирусной инфекции COVID-19 (литературный обзор). В кн.: *Новые импульсы развития: вопросы научных исследований. Сборник научных трудов*. Казань: СитИвент; 2021: 225–38.
4. Kannan S., Shaik S.A.P., Sheeza A. Evolving biothreat of variant SARS-CoV-2 — molecular properties, virulence and epidemiology. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2021; 25(12): 4405–12. https://doi.org/10.26355/eurrev_202106_26151
5. Lopez B.J., Andrews N., Gower C., Gallagher E., Simmons R., Thelwall S., et al. Effectiveness of COVID-19 vaccines against the B.1.617.2 (Delta) variant. *N. Engl. J. Med.* 2021; 385(7): 585–94. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2108891>
6. Connolly C., Keil R., Ali S.H. Extended urbanisation and the spatialities of infectious disease: Demographic change, infrastructure and governance. *Urban Stud.* 2020; 3(58): 245–63. <https://doi.org/10.1177/0042098020910873>

¹¹ Постановление Правительства Ростовской области «О внесении изменений в постановление Правительства Ростовской области от 05.04.2020 № 272» от 03.08.2021 № 622.

7. Бояркина А.В. Массовая миграция и эпидемия COVID-19 в Китае в период праздника весны 2020 г. *ДЕМИС. Демографические исследования*. 2021; 1(2): 113–25. <https://doi.org/10.19181/demis.2021.1.2.9>
8. Ковалев Е.В., Спись С.С., Янович Е.Г., Пичурина Н.Л., Волоникова С.В., Гаевская Н.Е. и др. Некоторые особенности эпидемического распространения новой коронавирусной инфекции (COVID-19) в Ростовской области. *Медицинский вестник Юга России*. 2020; 11(4): 99–106. <https://doi.org/10.21886/2219-8075-2020-11-4-99-106>
9. Блох А.И., Пеньевская Н.А., Рудаков Н.В., Лазарев И.И. Эпидемический потенциал COVID-19 в Омской области и оценка возможного влияния противоэпидемических мероприятий. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2020; 5(3): 8–17. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-8-17>
10. Акимкин В.Г., Кузин С.Н., Семенов Т.А., Шипулина О.Ю., Яцьшина С.Б., Тиванова Е.В. и др. Закономерности эпидемического распространения SARS-CoV-2 в условиях мегаполиса. *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(4): 203–11. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-203-11>
11. Сухинин С.А. Социально-экономическое районирование северо-восточной периферии Ростовской области в интересах формирования территориально сбалансированной концепции ее развития. *Региональная экономика: теория и практика*. 2015; (21): 36–47.
12. Носков А.К., Подойнищина О.А., Водопьянов А.С., Писанов Р.Р., Ковалев Е.В., Пеньковская Н.А. и др. Сравнительный анализ геномного разнообразия SARS-CoV-2, циркулирующих на территориях Ростовской области и Республики Крым в период с марта по июнь 2021 г. *Медицинский вестник Юга России*. 2021; 12(3): 62–71. <https://doi.org/10.21886/2219-8075-2021-12-3-62-71>
13. Черкасский Б.Л. *Риск в эпидемиологии*. М.: Практическая медицина; 2007.

REFERENCES

1. Malakhov V.S., Motin A.S. Impact of the COVID-19 pandemic on migration processes and migration policy in the European Union and Russia. *Monitoring ekonomicheskoy situatsii v Rossii: tendentsii i vyzovy sotsial'no-ekonomicheskogo razvitiya*. 2020; (17): 31–42. (In Russian)
2. Kononenko A.A., Noskov A.K., Vodyanitskaya S.Yu., Podoinitsina O.A. Human coronaviruses that can cause emergencies. *Meditsinskiy vestnik Yuga Rossii*. 2021; 12(1): 14–23. <https://doi.org/10.21886/2219-8075-2021-12-1-14-23> (in Russian)
3. Kapusta A.A. Molecular genetic characteristics of coronavirus infection COVID-19 (literature review). In: *New Impulses for Development: Research Issues. Collection of Scientific Papers [Novye impul'sy razvitiya: voprosy nauchnykh issledovaniy. Sbornik nauchnykh trudov]*. Kazan': SitIvent; 2021: 225–38. (in Russian)
4. Kannan S., Shaik S.A.P., Sheeza A. Evolving biothreat of variant SARS-CoV-2 – molecular properties, virulence and epidemiology. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2021; 25(12): 4405–12. https://doi.org/10.26355/eurrev_202106_26151
5. Lopez B.J., Andrews N., Gower C., Gallagher E., Simmons R., Thelwall S., et al. Effectiveness of Covid-19 vaccines against the B.1.617.2 (Delta) variant. *N. Engl. J. Med.* 2021; 385(7): 585–94. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2108891>
6. Connolly C., Keil R., Ali S.H. Extended urbanisation and the spatialities of infectious disease: Demographic change, infrastructure and governance. *Urban Stud.* 2020; 3(58): 245–63. <https://doi.org/10.1177/0042098020910873>
7. Boyarkina A.V. Mass migration and COVID-19 epidemic in China during spring festival 2020. *DEMIS. Demograficheskie issledovaniya*. 2021; 1(2): 113–25. <https://doi.org/10.19181/demis.2021.1.2.9> (in Russian)

8. Kovalev E.V., Slis' S.S., Yanovich E.G., Pichurina N.L., Volovikova S.V., Gaevskaya N.E., et al. Some features of the epidemic spread of the new coronavirus infection (COVID-19) in the Rostov region. *Meditsinskiy vestnik Yuga Rossii*. 2020; 11(4): 99–106. <https://doi.org/10.21886/2219-8075-2020-11-4-99-106> (in Russian)
9. Blokh A.I., Pen'evskaya N.A., Rudakov N.V., Lazarev I.I. Epidemic potential of COVID-19 in Omsk region and assessment of the anti-epidemic measures. *Fundamental'naya i klinicheskaya meditsina*. 2020; 5(3): 8–17. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-8-17> (in Russian)
10. Akimkin V.G., Kuzin S.N., Semenenko T.A., Shipulina O.Yu., Yatsyshina S.B., Tivanova E.V., et al. Patterns of the SARS-CoV-2 epidemic spread in a megacity. *Voprosy virusologii*. 2020; 65(4): 203–11. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-203-211> (in Russian)
11. Sukhinin S.A. Socio-economic zoning of the north-eastern periphery of the Rostov region in the interests of forming a territorially balanced concept of its development. *Regional'naya ekonomika: teoriya i praktika*. 2015; (21): 36–47. (in Russian)
12. Noskov A.K., Podoyntsyna O.A., Vodop'yanov A.S., Pisanov R.R., Kovalev E.V., Pen'kovskaya N.A., et al. Comparative analysis of the genomic diversity of SARS-COV-2 circulating in the territories of the Rostov region and the Republic of Crimea in the period from March to June 2021. *Meditsinskiy vestnik Yuga Rossii*. 2021; 12(3): 62–71. <https://doi.org/10.21886/2219-8075-2021-12-3-62-71> (in Russian)
13. Cherkasskiy B.L. *Risk in Epidemiology [Risk v epidemiologii]*. Moscow: Prakticheskaya meditsina; 2007. (in Russian)

Информация об авторах

Соболева Евгения Григорьевна[✉] — к.м.н., н.с. отдела эпидемиологии Ростовского-на-Дону противочумного института, Ростов-на-Дону, Россия, yanovich_eg@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7571-7848>

Ковалев Евгений Владимирович — руководитель Управления Роспотребнадзора по Ростовской области, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0840-4638>

Слис Сергей Сергеевич — главный специалист-эксперт отдела эпидемиологического надзора Управления Роспотребнадзора по Ростовской области, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2649-8949>

Пичурина Наталья Львовна — к.м.н., в.н.с., и.о. зав. отделом эпидемиологии Ростовского-на-Дону противочумного института, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1876-5397>

Конonenko Анна Александровна — м.н.с. лаб. экспериментальных биологических моделей и биобезопасности Ростовского-на-Дону противочумного института, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7929-1095>

Сокиркина Елена Николаевна — м.н.с. отдела эпидемиологии Ростовского-на-Дону противочумного института, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4864-9576>

Носков Алексей Кимович — к.м.н., директор Ростовского-на-Дону противочумного института, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0550-2221>

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

Статья поступила в редакцию 28.12.2021;
принята к публикации 15.03.2022;
опубликована 30.08.2022

Information about the authors

Evgeniya G. Soboleva[✉] — Cand. Sci. (Med.), researcher, Epidemiology department, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russia, yanovich_eg@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7575-7848>

Evgenij V. Kovalev — Chief, Surveillance of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare in the Rostov Region, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0840-4638>

Sergej S. Slis' — leading researcher, Department of epidemiological surveillance, Head Office of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare in the Rostov Region, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2649-8949>

Natalia L. Pichurina — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Acting Head, Epidemiology department, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1876-5397>

Anna A. Kononenko — junior researcher, Laboratory of experimental biological models and biosafety, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7929-1095>

Elena N. Sokirkina — junior researcher, Epidemiology department, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0002-4864-9576>

Alexey K. Noskov — Cand. Sci. (Med.), Director, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0550-2221>

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

The article was submitted 28.12.2021;
accepted for publication 15.03.2022;
published 30.08.2022

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-271>

Исследование *in vitro* механизмов взаимодействия грибов *Candida albicans* с *Klebsiella pneumoniae* и *Enterococcus faecalis*, выделенных из кишечного микробиома ВИЧ-инфицированных пациентов

Захарова Ю.В.^{1✉}, Отдушкина Л.Ю.¹, Марковская А.А.¹, Несвижский Ю.В.^{2,3},
Афанасьев С.С.³, Леванова Л.А.¹

¹Кемеровский государственный медицинский университет, Кемерово, Россия;

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

³Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия

Аннотация

Цель: определение *in vitro* мишеней для факторов антагонизма клебсиелл и энтерококков у грибов *Candida albicans*, выделенных из кишечного микробиома ВИЧ-инфицированных пациентов.

Материалы и методы. В экспериментах использованы 38 штаммов грибов *Candida albicans*, 28 штаммов *Klebsiella pneumoniae* и 30 штаммов *Enterococcus faecalis*, изолированных из кишечного микробиома 89 ВИЧ-инфицированных детей. Средний возраст пациентов составил 24 ± 2 мес, мальчиков было 49 (55%), девочек — 40 (45%). Микроорганизмы выделяли из кишечного биотопа с использованием селективных питательных сред HiChrome *Candida* Agar, HiChrome *Klebsiella* Selective Agar Base, Энтерококк-агар; проводили видовую идентификацию. В модельных экспериментах изучена антикаталазная активность экзометаболитов *E. faecalis* и влияние *K. pneumoniae* на морфологическую трансформацию грибов *C. albicans*.

Результаты. Клебсиеллы на 58,7% снижают интенсивность образования ростовых трубок у *C. albicans* ($p < 0,01$). При совместном культивировании 12,3% дрожжевых клеток дают ростовые трубки, тогда как в монокультуре грибов обнаружили 29,8% трансформированных клеток. Установлено, что экзометаболиты 65,7% штаммов *E. faecalis* снижают продукцию каталазы у *C. albicans*. Исходный уровень каталазы у интактных культур *C. albicans* в среднем составляет 1,02 мкмоль/мин оптической плотности, после обработки экзометаболитами *E. faecalis* снижается до 0,55 мкмоль/мин, т.е. на 46,1% ($p < 0,05$).

Выводы. *K. pneumoniae* и *E. faecalis* проявляют антагонизм к *C. albicans* с разной степенью выраженности. Мишенями для факторов антагонизма факультативной микробиоты у *C. albicans* являются морфологическая трансформация и продукция каталазы.

Ключевые слова: антагонизм, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, антикаталазная активность, морфологическая трансформация

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии законных представителей пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Кемеровского государственного медицинского университета (протокол № 5 от 31.01.2019).

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

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

Для цитирования: Захарова Ю.В., Отдушкина Л.Ю., Марковская А.А., Несвижский Ю.В., Афанасьев С.С., Леванова Л.А. Исследование *in vitro* механизмов взаимодействия грибов *Candida albicans* с *Klebsiella pneumoniae* и *Enterococcus faecalis*, выделенных из кишечного микробиома ВИЧ-инфицированных пациентов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(4):420–427.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-271>

An *in vitro* study of interactions of *Candida albicans* with *Klebsiella pneumoniae* and *Enterococcus faecalis* isolated from intestinal microbiome of HIV infected patients

Yuliya V. Zakharova¹✉, Larisa Yu. Otdushkina¹, Alina A. Markovskaya¹, Yuri V. Nesvizhsky^{2,3}, Stanislav S. Afanasiev³, Lyudmila A. Levanova¹

¹Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russia;

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

³G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Abstract

The aim: *In vitro* identification of targets for antagonism factors in klebsiellas and enterococci for *Candida albicans* isolated from the intestinal microbiome of HIV infected patients.

Materials and methods. The tests were performed using 38 *Candida albicans* strains, 28 *Klebsiella pneumoniae* strains, and 30 *Enterococcus faecalis* strains isolated from the intestinal microbiome of 89 HIV infected children. The mean age of the patients was 24 ± 2 months; the group consisted of 49 (55%) boys and 40 (45%) girls. Microorganisms were isolated from the intestinal biotope using such selective media as HiChrome *Candida* Agar, HiChrome *Klebsiella* Selective Agar Base, and *Enterococcus* Agar; the study included identification of species. Model experiments were performed to study anti-catalase activity of *E. faecalis* exometabolites and the impact of *K. pneumoniae* on morphological transformation of *C. albicans* fungi.

Results. Klebsiellas decrease the intensity of germ tube formation in *C. albicans* by 58.7% ($p < 0.01$). When cocultured, 12.3% of the yeast cells produce germ tubes, while 29.8% of transformed cells was detected in the fungal monoculture. It has been found that exometabolites of 65.7% of *E. faecalis* strains decrease production of catalase in *C. albicans*. The initial catalase level in untreated cultures of *C. albicans* averages 1.02 μmol/min of optical density; after they are treated with *E. faecalis* exometabolites, the level decreases to 0.55 μmol/min, i.e. by 46.1% ($p < 0.05$).

Conclusions. *K. pneumoniae* and *E. faecalis* demonstrate antagonism of different intensity toward *C. albicans*. Morphological transformation and catalase production are targets for antagonism factors of facultative microbiota in *C. albicans*.

Keywords: antagonism, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, anti-catalase activity, morphological transformation

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the legal representatives of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Kemerovo State Medical University (protocol No. 5, January 31, 2019).

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

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

For citation: Zakharova Yu.V., Otdushkina L.Yu., Markovskaya A.A., Nesvizhsky Y.V., Afanasiev S.S., Levanova L.A. An *in vitro* study of interactions of *Candida albicans* with *Klebsiella pneumoniae* and *Enterococcus faecalis* isolated from intestinal microbiome of HIV infected patients. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(4):420–427.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-271>

Введение

Кишечный микробиом представляет собой интегральную систему взаимодействующих микроорганизмов, которая способна к саморегуляции посредством формирования различных типов микробных взаимоотношений [1, 2]. Одним из факторов формирования микробиоценоза является антагонизм микробов [3]. Антагонизм симбионтов характеризуется синтезом антимикробных веществ [3], литических ферментов (пептидазы, амилазы), разрушающих структуры микроорганизмов или секретуемые ими молекулы [4, 5]. Некоторые бактерии

продуцируют низкомолекулярные вещества, изменяющие ростовые свойства и персистенцию бактерий за счёт влияния на их генетическую программу [6, 7], ингибирующие антиоксидантные системы конкурентов [8, 9], активирующие метаболические шунты, позволяющие конкурировать им за источники питания и железа [10].

Взаимодействия бактериального и грибкового микробиомов в кишечном биотопе играют центральную роль в формировании и поддержании симбиоза и определяют возможность развития кандидамикоза [3]. Бифидобактерии, лактобациллы

лы формируют антагонистические взаимоотношения с грибами, направленные на предотвращение избыточной грибковой колонизации различных биотопов [4, 11]. Есть работы, демонстрирующие взаимное действие факторов вирулентности условно-патогенных бактерий и грибов на макроорганизм, вплоть до развития патологических процессов [12]. Микромицеты и условно-патогенные бактерии, конкурируя за рецепторы на слизистой оболочке, вступают в антагонистические взаимоотношения с индигенной микробиотой. Однако, когда условно-патогенные бактерии достигают высокой плотности популяции, отмечают их антагонизм по отношению к грибам рода *Candida* [13].

При этом факторы антагонизма и мишени воздействия условно-патогенных бактерий разных таксономических групп на грибы, условия реализации антагонистических взаимоотношений, факторы регуляции антагонизма условно-патогенных симбионтов требуют дальнейшего изучения. Остается неясным вопрос о механизмах выживания грибов в условиях «двойного» антагонизма (индигенных и факультативных бактерий) кишечных симбионтов. Выяснение биокоммуникативных механизмов предотвращения развития эндогенной кандидозной инфекции особенно актуально для ВИЧ-инфицированных пациентов.

Цель работы — определение *in vitro* мишеней для факторов антагонизма клебсиелл и энтерококков у грибов *Candida albicans*, выделенных из кишечного микробиома ВИЧ-инфицированных пациентов.

Материалы и методы

В исследование включены 89 детей с диагнозом ВИЧ-инфекция, поступивших в отделение капельных инфекций Кемеровской областной клинической инфекционной больницы в 2019–2021 гг., из них 10 (11%) были госпитализированы по поводу вторичных бактериальных заболеваний (пневмонии, тонзиллиты) и 79 (89%) — по поводу острых респираторных вирусных инфекций. Средний возраст пациентов составил 24 ± 2 мес, мальчиков было 49 (55%), девочек — 40 (45%). У большинства (76,3%) детей была 2-я стадия ВИЧ-инфекции (2А — 4,5%; 2Б — 56,1%; 2В — 15,7%), у 14,6% — 3-я стадия, у 8,9% — 4-я стадия. Стадии ВИЧ-инфекции соответствуют классификации В.И. Покровского (2001) с дополнениями от 2006 г.¹

На проведение исследования было получено согласие Этического комитета КемГМУ (протокол

№ 5 от 31.01.2019). Законные представители всех пациентов, включённых в исследование, подписывали информированное добровольное согласие, дающее возможность использовать результаты исследования в научных целях.

В экспериментах использованы 38 штаммов грибов *C. albicans*, 28 штаммов *Klebsiella pneumoniae* и 30 штаммов *Enterococcus faecalis*, изолированных из кишечного биотопа. Выделение микроорганизмов проводили с помощью селективных и дифференциально-диагностических питательных сред. Для выделения *K. pneumoniae* использовали среду HiChrome *Klebsiella* Selective Agar Base («HIMEDIA»), посеvy культивировали при 37°C 24 ч. Пурпурные колонии пересекали на среду Клиглера (Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии (ГНЦ ПМБ)) для накопления чистой культуры и предварительного изучения биохимических свойств. Для выделения *E. faecalis* посеvy проводили на среду Энтерококк-агар (ГНЦ ПМБ), через 24 ч отбирали типичные колонии, изучали морфологию и проводили накопление чистых культур. Грибы *C. albicans* выделяли на среде «HiChrome *Candida* Agar» («HIMEDIA»), отбирали колонии, соответствующие *C. albicans* по цвету на дифференциальной шкале инструкции-производителя. Для того чтобы устранить возможность получения ложноотрицательного результата в экспериментах по ингибированию морфогенеза грибов, у всех штаммов определяли способность образовывать ростовые трубки в лошадиной сыворотке через 3 ч после культивирования при 37°C [14]. Окончательную видовую идентификацию всех микроорганизмов осуществляли на анализаторе «VITEK 2 Compact» («BioMerieux»). В экспериментах использовали пары *E. faecalis*–*C. albicans*, каждый симбионт в паре получен от одного и того же пациента, что позволило нивелировать феномен «чужого» [15]. Таким образом было сформировано 26 пар симбионтов. Эксперименты проведены дважды в 3 повторностях.

Оценивали влияние *K. pneumoniae* на морфологическую трансформацию грибов *C. albicans* [14]. Предварительно культуры *K. pneumoniae* выращивали на среде Мюллера–Хинтона (ГНЦ ПМБ) в течение 18 ч при 37°C, грибы *C. albicans* — на агаре Сабуро ГРМ (ГНЦ ПМБ) в течение 24 ч, что соответствовало окончанию стадии экспоненциального роста [16]. Готовили взвесь *C. albicans* в стерильном 0,9% растворе NaCl мутностью 0,5 ед. Мак-Фарланда, что соответствовало $1-5 \times 10^6$ КОЕ/мл [17]. Взвесь клебсиелл готовили с такой же мутностью, поэтому дополнительно взвесь разводили в 100 раз. Конечная концентрация клебсиелл составила 1×10^6 КОЕ/мл. В пробирку с 0,5 мл лошадиной сыворотки (НПО «Микроген») помещали по 100 мкл взвеси *K. pneumoniae* и *C. albicans*. Инкуби-

¹ Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 17.03.2006 № 166 «Инструкция по заполнению годовой формы федерального государственного статистического наблюдения № 61 «Сведения о контингентах больных ВИЧ-инфекцией».

ровали микроорганизмы при 37°C. Через 3 ч делали мазки «раздавленная капля» и просматривали под микроскопом «Carl Zeiss Primostar» 100 клеток грибов *C. albicans*, учитывали процент клеток, образующих ростовые трубки. В качестве контроля использовали интактные культуры грибов *C. albicans*, у которых также определяли способность образовывать ростовые трубки в белковой среде.

Исследовали влияние экзометаболитов *E. faecalis* на каталазу грибов *C. albicans* по методике [9] с модификациями. Модификация заключалась в использовании вместо нестойкого йодида калия стабильного молибдата аммония. Из двухсуточной бульонной культуры *E. faecalis* получали супернатант, двукратно центрифугируя культуру при 3000 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость отделяли от бактериальных клеток с помощью мембранных фильтров. Из культур *C. albicans* готовили взвесь в стерильном 0,9% физиологическом растворе плотностью 0,5 ед. по Мак-Фарланду. Опытные пробы готовили путём смешивания 0,1 мл взвеси грибов *C. albicans*, 2,6 мл бульона Сабуро и 0,3 мл супернатанта из бульонных культур *E. faecalis*. В качестве сравнения использовали показатели каталазной активности бульонных культур грибов, не экспонированных с экзометаболитами энтерококков (0,1 мл взвеси грибов и 2,9 бульона). Для определения активности каталазы в опытные образцы и в образцы сравнения объёмом по 0,2 мл добавляли по 1 мл 0,0125 М раствора H_2O_2 , через 10 мин реакцию останавливали добавлением 1 мл 4% раствора молибдата аммония. Оставшаяся неинaktivированной H_2O_2 образовывала с молибдатом аммония окрашенные комплексы, оптическую плотность (ОП) которых оценивали спектрофотометрически на приборе «СФ 2000» (ОКБ «Спектр») при $\lambda = 550$ нм против питательной среды. Расчёт активности каталазы проводили по формуле, согласно используемой методике [9]. Полученные результаты сравнивали с каталазной активностью культур *C. albicans*, не обработанных супернатантами энтерококков.

Для статистического анализа использовали программный комплекс анализа данных «IBM SPSS Statistics / PS IMAGO 5» («IBM/Predictive Solutions Sp z.o.o.»). Проверку гипотезы о нормальности распределения переменных в рассматриваемых совокупностях оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для сравнительного анализа применяли непараметрические методы оценки статистической значимости (критерий χ^2 и критерий Манна–Уитни) [18]. Экспериментальные данные представлены в виде среднего значения и среднеквадратичного отклонения, медианы с интерквартильным размахом (Ме [25-й; 75-й квартили]). Критический уровень ошибки при проверке статистических гипотез принимали равным или менее 0,05 [18].

Результаты

В экспериментах установлено, что *K. pneumoniae* ингибирует способность грибов образовывать ростовые трубки. При совместном культивировании с клебсиеллами в среднем 12,3 [6,33; 15]% дрожжевых клеток давали ростовые трубки, тогда как в монокультуре грибов обнаруживали 29,8 [25; 36,7]% клеток с бластоспорами. Таким образом, ингибирование морфологической трансформации *C. albicans* в ассоциациях с *K. pneumoniae* составило 58,72% ($p < 0,01$).

Супернатанты энтерококков по-разному воздействовали на грибы *C. albicans* (таблица). В 65,4% случаев энтерококки ингибировали каталазу микромицетов, в 19,2% случаев каталазная активность у грибов после обработки супернатантами *E. faecalis* не изменялась, и только в 15,4% случаев продукция каталазы увеличивалась. Исходный уровень каталазы у интактных культур *C. albicans* в среднем составил 1,02 [0,87; 1,13] мкмоль/мин ОП, после обработки экзометаболитами *E. faecalis* снизился до 0,55 [0,36; 0,73] мкмоль/мин ОП ($p < 0,05$).

В среднем каталазная активность *C. albicans* ингибировалась на 46,1% ($p < 0,05$).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что антагонизм клебсиелл и энтерококков по отношению к *C. albicans* имеет разные таргетные точки, разную степень выраженности и является результатом конкурентной борьбы в многокомпонентном микробном сообществе.

Обсуждение

В условиях роста числа ВИЧ-инфицированных кандидозы являются широко распространённым сопутствующим заболеванием, поэтому актуален поиск новых подходов в предупреждении развития процесса и своевременной диагностике оппортунистического микоза до появления симптомов [19]. Перспективно использование биоценологических связей и факторов, позволяющих регулировать биологические свойства *C. albicans* в микробиоценозах и нивелировать реализацию их патогенного потенциала [20, 21]. Независимо от биотопа постоянная микробиота регулирует вирулентность *C. albicans*. Под влиянием молочной кислоты и бактериоцинов, продуцируемых *Lactobacillus* spp., угнетается активность генов пролиферации и тормозится рост и образование гифов у *C. albicans*, снижается экспрессия гифальных белков адгезии (Als3 и Hwp1) [11, 12]. Антибиоплёночный эффект в отношении грибов оказывают масляная, пентадекановая кислоты как продукты метаболизма жирных кислот анаэробных бактерий [22]. В основе антагонизма со стороны *E. faecalis* лежит также секреция бактериоцина (ENTV), ингибирующего образование гифов, влияющего на формирование биопленок *C. albicans*. Микроорганизмы рода *Bacteroides*, *Prevotella*,

Влияние экзометаболических *E. faecalis* на каталазную активность *C. albicans* ($M \pm SD$)The influence of *E. faecalis* exometabolites on the catalase activity of *C. albicans* ($M \pm SD$)

№ пары симбионтов Pair of symbionts	Исходный уровень каталазы, мкмоль/мин ОП, контроль Initial catalase level, $\mu\text{mol}/\text{min OD}$, control	Уровень каталазы после обработки экзометаболическими, мкмоль/мин ОП, опыт Catalase level after exometabolite treatment, $\mu\text{mol}/\text{min OD}$, experience	Изменение каталазной активности, % Change in catalase activity, %
Уменьшение активности каталазы / Decrease in catalase activity			
1	1,09 ± 0,03	0,57 ± 0,02	47,7
2	1,26 ± 0,04	0,53 ± 0,02	57,9
3	0,56 ± 0,05	0,25 ± 0,03	55,4
4	1,42 ± 0,03	0,75 ± 0,02	47,2
5	1,28 ± 0,05	0,65 ± 0,03	49,2
6	0,93 ± 0,05	0,37 ± 0,04	60,2
7	1,07 ± 0,04	0,47 ± 0,02	56,1
8	1,05 ± 0,04	0,65 ± 0,08	38,1
9	0,87 ± 0,05	0,35 ± 0,02	59,8
10	1,41 ± 0,02	0,74 ± 0,03	47,5
11	1,14 ± 0,05	1,09 ± 0,01	4,40
12	1,11 ± 0,05	0,75 ± 0,03	32,4
13	0,90 ± 0,07	0,72 ± 0,02	20,0
14	0,86 ± 0,04	0,43 ± 0,02	50,0
15	0,77 ± 0,03	0,33 ± 0,02	57,1
16	0,87 ± 0,03	0,23 ± 0,02	73,6
17	1,06 ± 0,03	0,26 ± 0,05	75,5
Повышение активности каталазы / Increased catalase activity			
18	0,57 ± 0,31	1,17 ± 0,07	105,3
19	0,78 ± 0,08	1,16 ± 0,04	48,7
20	0,74 ± 0,07	1,09 ± 0,03	47,3
21	0,13 ± 0,02	0,57 ± 0,09	338,5
Активность каталазы не изменялась / Catalase activity did not change			
22	0,78 ± 0,01	0,78 ± 0,03	0,00
23	1,17 ± 0,05	1,18 ± 0,03	0,00
24	0,98 ± 0,03	0,97 ± 0,03	0,00
25	0,56 ± 0,11	0,45 ± 0,01	0,00
26	0,42 ± 0,02	0,43 ± 0,02	0,00

Bifidobacterium снижают антикомплементарную активность грибов [23].

При взаимодействии грибов с условно-патогенной микробиотой чаще описывают взаимное усиление антагонизма к индигенными бактериям [23]. В бактериально-грибковых ассоциациях грибы чаще выступают «помощниками» факультативных микроорганизмов. Метаболиты грибов *Candida* усиливают антилизоцимную активность *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* spp., *E. coli lac-hly+*, оказывают прямое ингибирующее воздействие на антилизоцимный фактор бифидобактерий [24]. Компонент клеточной стенки *C. albicans* b-1,3-глюкан повышает устойчивость *S. aureus* к антибиотикам [25]. Однако появляются данные, демонстрирующие, что

условно-патогенные бактерии при высокой плотности популяции так же, как индигенные микроорганизмы, проявляют антагонизм к грибам [22, 26].

Исследованы некоторые молекулярные механизмы межмикробных взаимодействий *C. albicans* с *K. pneumoniae* и *E. faecalis*, изолированных от ВИЧ-инфицированных пациентов. В целом взятые в опыт виды бактерий проявляют антагонизм по отношению к *C. albicans*, что согласуется с данными зарубежных исследователей [13].

Установлено, что *K. pneumoniae* обладают эффективным биопотенциалом по регуляции численности *C. albicans*. Мишенью для *K. pneumoniae* является морфологическая трансформация *C. albicans*. Морфогенез грибов в гифальную форму рас-

смаатривают как фактор патогенности микромицетов, т.к. у них увеличиваются спектр адгезинов для слизистых, скорость распространения в тканях, количество фосфолипаз, которые концентрируются на концах гифальных элементов [27].

Антагонизм по отношению к грибам регистрировали не только со стороны *K. pneumoniae*, но и со стороны *E. faecalis*. *E. faecalis* ингибировали каталазу, которая является мощным антиоксидантным ферментом у микроорганизмов с аэробным типом дыхания [28, 29]. Изменение активности или ингибирование ферментов антиоксидантных систем у микроорганизмов ведёт к накоплению токсических форм кислорода, что отражается на проницаемости мембраны, скорости поступления питательных веществ и в целом на скорости пролиферации микроорганизмов [30, 31].

Заключение

Полученные результаты дополняют данные о роли факультативных бактерий в функционировании кишечного микробиома и демонстрируют их регулирующее влияние на *C. albicans*. В основе антагонизма факультативных бактерий по отношению к *C. albicans* лежит ингибирование морфологической трансформации и продукции каталазы, что перспективно для разработки методов предупреждения развития кандидоза, основанных на усилении антагонизма не только постоянной, но и факультативной микробиоты. Результаты экспериментов и подходы к изучению бактериально-грибковых взаимоотношений имеют значительную научно-практическую перспективу, т.к. позволяют осуществлять моделирование *in vitro* процесса управления биологическими свойствами грибов рода *Candida* с помощью факторов антагонизма кишечной бактериальной микробиоты.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Хайтович А.Б., Воеводкина А.Ю. Микробиом и его влияние на здоровье человека. *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины*. 2019; 9(1): 61–70. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01931-x>
2. Dekaboruah E., Suryavanshi M.V., Chettri D., Verma A.K. Human microbiome: an academic update on human body site specific surveillance and its possible role. *Arch. Microbiol.* 2020; 202(8): 2147–67. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01931-x>
3. Adadea E.E., Lakhena K.A., Lemusa A.A., Valm A.M. Recent progress in analyzing the spatial structure of the human microbiome: Distinguishing biogeography and architecture in the oral and gut communities. *Curr. Opinion Endocr. Metab. Res.* 2021; 18: 275–83. <https://doi.org/10.1016/j.coemr.2021.04.005>
4. Meisner A., Wepner B., Kostic T., Overbeek L.S., Bunthof C.J., Souza S.R.C., et al. Calling for a systems approach in microbiome research and innovation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2022; 73: 171–8. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.08.003>
5. Олескин А.В., Эль-Регистан Г.И., Шендеров Б.А. Межмикробные химические взаимодействия и диалог микробио-

- та-хозяин: роль нейромедиаторов. *Микробиология*. 2016; 85(1): 3–25. <https://doi.org/10.7868/S0026365616010080>
6. Бухарин О.В., Андрущенко С.В., Перунова Н.Б., Иванова Е.В. Механизмы персистенции индигенных бифидобактерий под действием ацетата в кишечном биотопе человека. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021; 98(3): 276–82. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-86>
7. Бухарин О.В. Инфекционная симбиология — новое понимание старых проблем. *Вестник Российской академии наук*. 2016; 86(10): 915–20. <https://doi.org/10.7868/S0869587316070033>
8. Green J., Crack J.C., Thomson A.J., LeBrum N.E. Bacterial sensors of oxygen. *Curr. Opin. Microbiol.* 2009; 12(2): 145–51. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.01.008>
9. Bukharin O.V., Sgibnev A.V., Cherkasov S.V., Ivanov I.B. The effect of the intra and extracellular metabolites of microorganisms isolated from various ecotopes on the catalase activity of *Staphylococcus aureus* 6538P. *Mikrobiologiya*. 2002; 71(2): 183–6.
10. Миронов А.Ю., Леонов В.В. Железо, вирулентность и межмикробные взаимодействия условно-патогенных микроорганизмов. *Успехи современной биологии*. 2016; 136(3): 301–10.
11. Boris S., Barbés C. Role played by Lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. *Microbes Infect.* 2000; 2(5): 543–6. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(00\)00313-0](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(00)00313-0)
12. Mayer F.L., Wilson D., Hube B. Candida albicans pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013; 4(2): 119–28. <https://doi.org/10.4161/viru.22913>
13. Wang F., Yea Y., Xina C., Liua F., Zhao C., Xiang L., et al. Candida albicans triggers qualitative and temporal responses in gut bacteria. *J. Mycol. Med.* 2021; 31(3): 101164. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2021.101164>
14. Елинов Н.П., Васильева Н.В., Степанова А.А., Чилина Г.А. *Candida*. Кандидозы. *Лабораторная диагностика*. СПб.: Коста; 2010.
15. Бухарин О.В., Перунова Н.Б., Иванова Е.В., Андрущенко С.В. Межмикробное распознавание «свой–чужой» в паре «доминант–ассоциант» пробиотических штаммов *Escherichia coli* M17 и *Escherichia coli* ЛЭГМ 18. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2016; 93(3): 3–9.
16. Тимохина Т.Х., Николенко М.В. Суточная динамика темпа роста микроорганизмов в бактериально-грибковых ассоциациях. *Медицинская наука и образование Урала*. 2010; 11(4): 84–6.
17. Gandhi B., Summerbell R., Mazzulli T. Evaluation of the Copan ESwab transport system for viability of pathogenic fungi by use of a modification of clinical and laboratory standards institute document M40-A2. *J. Clin. Microbiol.* 2018; 56(2): e01481-17. <https://doi.org/10.1128/JCM.01481-17>
18. Новиков Д.А., Новочадов В.В. *Статистические методы в медико-биологическом эксперименте (типовые случаи)*. Волгоград; 2005.
19. Акинфиев И.Б., Кубрак Д.Н., Балмасова И.П., Шестакова И.В., Ющук Н.Д. Оппортунистические инфекции небактериальной природы как причина летальных исходов у ВИЧ-инфицированных пациентов. Часть II. Микозы. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2015; 7(4): 17–27.
20. Kalia N., Singh J., Kaur M. Microbiota in vaginal health and pathogenesis of recurrent vulvovaginal infections: a critical review. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2020; 19(1): 5. <https://doi.org/10.1186/s12941-020-0347-4>
21. Леонов В.В., Миронов А.Ю., Пачганов С.А., Леонова Л.В., Булатов И.А. Рост и экспрессия факторов вирулентности *Candida albicans* при экспериментальной инфекции у мышей в зависимости от нагрузки организма железом. *Успехи медицинской микологии*. 2017; 17: 174–5.

22. Galdiero E., Ricciardelli A., D'Angelo C., Alteriis E., Maione A., Albarano L., et al. Pentadecanoic acid against *Candida albicans* — *Klebsiella pneumoniae* biofilm: towards the development of an anti-biofilm coating to prevent polymicrobial infections. *Res. Microbiol.* 2021; 172(7-8): 103880. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2021.103880>
 23. Бухарин О.В., Перунова Н.Б., Челпаченко О.Е., Иванова Е.В., Черных Л.П. Роль межмикробных взаимодействий *Candida* spp. при патологии опорно-двигательного аппарата у детей. *Проблемы медицинской микологии.* 2013; 15(3): 14–7.
 24. Cheng R., Xu Q., Hu F., Li H., Yang B., Duan Z., et al. Antifungal activity of MAF-1A peptide against *Candida albicans*. *Int. Microbiology.* 2021; 24(2): 233–42. <https://doi.org/10.1007/s10123-021-00159-z>
 25. Charlet R., Bortolus C., Barbet M., Sendid B., Jawhara S. A decrease in anaerobic bacteria promotes *Candida glabrata* overgrowth while β -glucan treatment restores the gut microbiota and attenuates colitis. *Gut Pathog.* 2018; 10: 50. <https://doi.org/10.1186/s13099-018-0277-2>
 26. Лисовская С.А., Халдеева Л.В., Глушко Н.И. Взаимодействие *Candida albicans* и бактерий-ассоциантов при кандидозах различной локализации. *Проблемы медицинской микологии.* 2013; 15(2): 40–3.
 27. Pinto E., Queiroz M.J., Vale-Silva L.A., Oliveira J.F., Begouin A., Begouin J.M., et al. Antifungal activity of synthetic di(hetero)arylamines based on the benzo[b]thiophene moiety. *Bioorg. Med. Chem.* 2008; 16(17): 8172–7. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.07.042>
 28. Saville S.P., Lazzell A.L., Monteagudo C., Lopez-Ribot J.L. Engineered control of cell morphology *in vivo* reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot. Cell.* 2003; 2(5): 1053–60. <https://doi.org/10.1128/EC.2.5.1053-1060.2003>
 29. Курбанов А.И. Экспериментальное изучение роли антиоксидантных ферментов *Candida albicans* в патогенезе кандидоза. *Проблемы медицинской микологии.* 2008; 10(2): 14–6.
 30. Diezmann S. Oxidative stress response and adaptation to H₂O₂ in the model eukaryote *Saccharomyces cerevisiae* and its human pathogenic relatives *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Fungal Biol. Rev.* 2014; 28(4): 126–36. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2014.12.001>
 31. Шипко Е.С., Дуванова О.В. Изменение спектра жирных кислот как один из механизмов адаптации/персистенции микроорганизмов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2019; 96(5): 109–118. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-5-109-118>
- REFERENCES
1. Khaytovich A.B., Voevodkina A.Yu. Microbiomes and his effects on human health. *Krymskiy zhurnal eksperimental'noy i klinicheskoy meditsiny.* 2019; 9(1): 61–70. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01931-x> (in Russian)
 2. Dekaboruah E., Suryavanshi M.V., Chettri D., Verma A.K. Human microbiome: an academic update on human body site specific surveillance and its possible role. *Arch. Microbiol.* 2020; 202(8): 2147–67. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01931-x>
 3. Adadea E.E., Lakhena K.A., Lemusa A.A., Valm A.M. Recent progress in analyzing the spatial structure of the human microbiome: Distinguishing biogeography and architecture in the oral and gut communities. *Curr. Opinion Endocr. Metab. Res.* 2021; 18: 275–83. <https://doi.org/10.1016/j.coemr.2021.04.005>
 4. Meisner A., Wepner B., Kostic T., Overbeek L.S., Bunthof C.J., Souza S.R.C., et al. Calling for a systems approach in microbiome research and innovation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2022; 73: 171–8. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.08.003>
 5. Oleskin A.V., El'-Registan G.L., Shenderov B.A. Role of neuro-mediators in the functioning of the human microbiota: «Business talks» among microorganisms and the microbiota–host dialogue. *Mikrobiologiya.* 2016; 85(1): 1–22. <https://doi.org/10.7868/S0026365616010080>
 6. Bukharin O.V., Andryushchenko S.V., Perunova N.B., Ivanova E.V. Mechanism of persistence of indigenous bifidobacteria under the impact of acetate in the human colon biotope. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2021; 98(3): 276–82. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-86> (in Russian)
 7. Bukharin O.V. Infectious symbiology: a new understanding of old problems. *Vestnik Rossiyskoy akademii nauk.* 2016; 86(5): 396–401. <https://doi.org/10.1134/S101931616040018>
 8. Green J., Crack J.C., Thomson A.J., LeBrum N.E. Bacterial sensors of oxygen. *Curr. Opin. Microbiol.* 2009; 12(2): 145–51. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.01.008>
 9. Bukharin O.V., Sgibnev A.V., Cherkasov S.V., Ivanov I.B. The effect of the intra and extracellular metabolites of microorganisms isolated from various ecotopes on the catalase activity of *Staphylococcus aureus* 6538P. *Mikrobiologiya.* 2002; 71(2): 183–6.
 10. Mironov A.Yu., Leonov V.V. Iron, virulence and intermicrobial interactions of opportunistic pathogens. *Uspekhi sovremennoy biologii.* 2016; 136(3): 301–10. (in Russian)
 11. Boris S., Barbés C. Role played by *Lactobacilli* in controlling the population of vaginal pathogens. *Microbes Infect.* 2000; 2(5): 543–6. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(00\)00313-0](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(00)00313-0)
 12. Mayer F.L., Wilson D., Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence.* 2013; 4(2): 119–28. <https://doi.org/10.4161/viru.22913>
 13. Wanga F., Yea Y., Xina C., Liua F., Zhaoa C., Xiang L., et al. *Candida albicans* triggers qualitative and temporal responses in gut bacteria. *J. Mycol. Med.* 2021; 31(3): 101164. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2021.101164>
 14. Elinov N.P., Vasil'eva N.V., Stepanova A.A., Chilina G.A. *Candida. Candidiasis. Laboratory Diagnostics [Candida. Kandidozy. Laboratornaya diagnostika]*. St. Petersburg: Kosta; 2010. (in Russian)
 15. Bukharin O.V., Perunova N.B., Ivanova E.V., Andryushchenko S.V. Intermicrobial "self-non-self" discrimination in "dominant–associate" pair of probiotic strains of *Escherichia coli* M-17 and *E. coli* LEGM-18. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2016; 93(3): 3–9. (in Russian)
 16. Timokhina T.Kh., Nikolenko M.V. Daily dynamics of rate of increase of microorganisms in bacterial-fungoid associations. *Meditinskaya nauka i obrazovanie Urala.* 2010; 11(4): 84–6. (in Russian)
 17. Gandhi B., Summerbell R., Mazzulli T. Evaluation of the Copan ESwab transport system for viability of pathogenic fungi by use of a modification of clinical and laboratory standards institute document M40-A2. *J. Clin. Microbiol.* 2018; 56(2): e01481-17. <https://doi.org/10.1128/JCM.01481-17>
 18. Novikov D.A., Novochadov V.V. *Statistical Methods in a Biomedical Experiment (Typical Cases) [Statisticheskie metody v mediko-biologicheskomeksperimente (tipovye sluchai)]*. Volgograd; 2005. (in Russian)
 19. Akinfiev I.B., Kubrak D.N., Balmasova I.P., Shestakova I.V., Yushchuk N.D. Opportunistic infections non-bacterial nature as the cause of death in HIV infected patients. Part II. Mycosis. *VICH-infektsiya i immunosupressii.* 2015; 7(4): 17–27. (in Russian)
 20. Kalia N., Singh J., Kaur M. Microbiota in vaginal health and pathogenesis of recurrent vulvovaginal infections: a critical review. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2020; 19(1): 5. <https://doi.org/10.1186/s12941-020-0347-4>
 21. Leonov V.V., Mironov A.Yu., Pachganov S.A., Leonova L.V., Bulatov I.A. The growth and expression of virulence factors of *Candida albicans* in experimental infections in mice, depending on the load of the body iron. *Uspekhi meditsinskoy mikologii.* 2017; 17: 174–5. (in Russian)

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

22. Galdiero E., Ricciardelli A., D'Angelo C., Alteriis E., Maione A., Albarano L., et al. Pentadecanoic acid against *Candida albicans* — *Klebsiella pneumoniae* biofilm: towards the development of an anti-biofilm coating to prevent polymicrobial infections. *Res. Microbiol.* 2021; 172(7-8): 103880. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2021.103880>
23. Bukharin O.V., Perunova N.B., Chelpachenko O.E., Ivanova E.V., Chernykh L.P. Role of *Candida* spp. intermicrobial interactions in pathology of locomotor apparatus in children. *Problemy meditsinskoy mikologii.* 2013; 15(3): 14–7. (in Russian)
24. Cheng R., Xu Q., Hu F., Li H., Yang B., Duan Z., et al. Antifungal activity of MAF-1A peptide against *Candida albicans*. *Int. Microbiology.* 2021; 24(2): 233–42. <https://doi.org/10.1007/s10123-021-00159-z>
25. Charlet R., Bortolus C., Barbet M., Sendi B., Jawhara S. A decrease in anaerobic bacteria promotes *Candida glabrata* overgrowth while β -glucan treatment restores the gut microbiota and attenuates colitis. *Gut Pathog.* 2018; 10: 50. <https://doi.org/10.1186/s13099-018-0277-2>
26. Lisovskaya S.A., Khaldeeva L.V., Glushko N.I. Interaction of *Candida albicans* and associated bacteria in candidosis of various localization. *Problemy meditsinskoy mikologii.* 2013; 15(2): 40–3. (in Russian)
27. Pinto E., Queiroz M.J., Vale-Silva L.A., Oliveira J.F., Begouin A., Begouin J.M., et al. Antifungal activity of synthetic di(hetero)arylamines based on the benzo[b]thiophene moiety. *Bioorg. Med. Chem.* 2008; 16(17): 8172–7. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.07.042>
28. Saville S.P., Lazzell A.L., Monteagudo C., Lopez-Ribot J.L. Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot. Cell.* 2003; 2(5): 1053–60. <https://doi.org/10.1128/EC.2.5.1053-1060.2003>
29. Kurbanov A.I. The role of candida albicans' antioxidant enzymes on pathogenesis in candidosis (experimental studying). *Problemy meditsinskoy mikologii.* 2008; 10(2): 14–6. (in Russian)
30. Diezmann S. Oxidative stress response and adaptation to H₂O₂ in the model eukaryote *Saccharomyces cerevisiae* and its human pathogenic relatives *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Fungal Biol. Rev.* 2014; 28(4): 126–36. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2014.12.001>
31. Shipko E.S., Duvanova O.V. Changing the spectrum of fatty acids as one of the mechanisms of adaptation/persistence of microorganisms. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2019; 96(5): 109–118. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-5-109-118> (in Russian)

Информация об авторах

Захарова Юлия Викторовна[✉] — д.м.н., доцент, профессор каф. микробиологии и вирусологии КемГМУ, Кемерово, Россия, yvz@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3475-9125>

Отдушкина Лариса Юрьевна — ассистент каф. микробиологии и вирусологии КемГМУ, Кемерово, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4126-4312>

Марковская Алина Анатольевна — ассистент каф. эпидемиологии, инфекционных болезней и дерматовенерологии КемГМУ, Кемерово, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5001-7068>

Несвижский Юрий Владимирович — д.м.н., профессор, профессор каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии ПМГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия; г.н.с. МНИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0386-3883>

Афанасьев Станислав Степанович — д.м.н., профессор, г.н.с. МНИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6497-1795>

Леванова Людмила Александровна — д.м.н., доцент, зав. каф. микробиологии и вирусологии КемГМУ, Кемерово, Россия, <https://orcid.org/0000-00025977-9149>

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

Статья поступила в редакцию 24.04.2022;
принята к публикации 23.06.2022;
опубликована 30.08.2022

Information about the authors

Yuliya V. Zakharova[✉] — D. Sci. (Med.), Associate Professor, Professor, Department of microbiology and virology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russia, yvz@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3475-9125>

Larisa Yu. Otdushkina — Assistant Professor, Department of microbiology and virology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4126-4312>

Alina A. Markovskaya — Assistant Professor, Department of epidemiology, infectious diseases and dermatovenerology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5001-7068>

Yuri V. Nesvizhsky — D. Sci. (Med.), Professor, Department of microbiology, virology and immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia; main researcher, Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0386-3883>

Stanislav S. Afanasiev — D. Sci. (Med.), Professor, main researcher, Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6497-1795>

Lyudmila A. Levanova — D. Sci. (Med.), Associate Professor, Head, Department of microbiology and virology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5977-9149>

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

The article was submitted 24.04.2022;
accepted for publication 23.06.2022;
published 30.08.2022

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-257>

К оценке этиологической значимости бактерий, детектированных в генитальном тракте мужчин

Годовалов А.П.^{1✉}, Николаева Н.В.¹, Карпунина Т.И.¹, Оборин Д.А.²

¹Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера, Пермь, Россия;

²Пермский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, Пермь, Россия

Аннотация

Введение. В настоящее время отмечается возрастающее значение микробных ассоциаций в патогенезе генитальных воспалительных заболеваний. Однако нерешенными остаются вопросы расшифровки таксономической принадлежности и диагностической значимости детектируемых при этом бактерий.

Цель исследования — пересмотр диагностической значимости количественного подхода при определении этиологической роли условно-патогенных микроорганизмов в андрологии.

Материалы и методы. Для исследования использовали пробы эякулята и/или отделяемого из уретры 15 мужчин, состоявших в бесплодном браке, 12 — с подтвержденным диагнозом «острая генитальная гонококковая инфекция». Проводили классическое бактериологическое исследование. Метагеномное исследование 16S рибосомальной РНК образцов осуществлено в отделе коллекционных культур ФБУН ГНЦ ПМБ. Для стандартизации распределения образцов по группам с учётом показателей альфа-разнообразия и концентрации путресцина использовали размах вариации и среднее линейное отклонение.

Результаты. Микробный пейзаж эякулята характеризовался преобладанием представителей родов *Enterococcus*, *Neisseria*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Prevotella*, *Bacteroides*. В эякуляте детектировали устойчивые ассоциации *E. faecalis* и *M. osloensis*. При использовании культурального метода представители рода *Moraxella* не были выделены ни в одной пробе. Показано, что разночтения могут не только затрагивать количественные показатели, но и выявлять несоответствия качественной оценки детектированных генетических маркеров с результатами идентификации в бактериологическом исследовании отдельных представителей соименных и фенотипически сходных таксонов.

Обсуждение. Результаты настоящего исследования указывают на то, что при меньшем разнообразии условно-патогенных микроорганизмов больше возможностей для реализации своего патогенного потенциала. С другой стороны, в составе сложного сообщества, когда альфа-разнообразие больше, его реализация затруднена из-за сложных межмикробных отношений, с одной стороны, и необходимостью выживать — с другой.

Заключение. Наиболее перспективным следует признать комплексное использование культуромикри и метагеномики с учётом сравнительного статистического анализа получаемых качественных и количественных показателей.

Ключевые слова: микробное сообщество, культивирование, метагеномное исследование, полиамины

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ПГМУ им. акад. Е.А. Вагнера (протокол № 11 от 11.01.2021).

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

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

Для цитирования: Годовалов А.П., Николаева Н.В., Карпунина Т.И., Оборин Д.А. К оценке этиологической значимости бактерий, детектированных в генитальном тракте мужчин. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(4):428–435.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-257>

On the assesment of the etiologial significance of bacteria detected in the male genital tract

Anatoliy P. Godovalov^{1✉}, Nina V. Nikolaeva¹, Tamara I. Karpunina¹, Denis A. Oborin²

¹E.A. Vagner Perm State Medical University, Perm, Russia;

²Perm Regional Center for the Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases, Perm, Russia

Abstract

Introduction. Currently, there is an increasing importance of microbial associations in the pathogenesis of genital inflammatory diseases. However, the issues of deciphering the taxonomic affiliation and the diagnostic significance of the bacteria detected in this case remain unresolved. The **aim** of the study was to review the diagnostic significance of the quantitative approach in determining the etiologial role of microorganisms in andrology.

Materials and methods. For the study, samples of ejaculate and/or discharge from the urethra from 15 men who were in infertile marriages, 12 with a confirmed diagnosis of "acute genital gonococcal infection" were used. The testing included a classic bacteriological study and the metagenomic analysis of 16S ribosomal RNA samples carried out at the Department of Collection Cultures of the State Research Center for Applied Microbiology (Obolensk). To standardize the distribution of samples into groups based on the indicators of alpha diversity and the concentration of putrescine, the range of variation and the average linear deviation were used. Statistical analysis of the obtained data was carried out using Excel software (MS Office package).

Results. The microbial landscape of the ejaculate was characterized by the predominance of representatives of the genera *Enterococcus*, *Neisseria*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Prevotella*, *Bacteroides*. Stable associations of *E. faecalis* and *M. osloensis* were detected in the ejaculate. When using the cultural method, representatives of the genus *Moraxella* were not isolated in any sample. It was shown that discrepancies can affect not only quantitative indicators, but also reveal inconsistencies between the qualitative assessment of detected genetic markers and the results of identification in a bacteriological study of individual representatives of similar or phenotypically similar taxa.

Discussion. The results of this study indicate that the lesser diversity of opportunistic pathogens gives them more opportunities to realize their pathogenic potential. On the other hand, in a complex community with greater alpha diversity, its realization is hindered by a complex intermicrobial relationships and the need to survive.

Conclusion. As a result, it seems that the most promising approach is the integrated use of cultural methods and metagenomics with a comparative statistical analysis of the obtained qualitative and quantitative indicators.

Keywords: *microbial community, cultivation, metagenomic research, polyamines*

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the E.A. Vagner Perm State Medical University (protocol No. 11, January 11, 2021).

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

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

For citation: Godovalov A.P., Nikolaeva N.V., Karpunina T.I., Oborin D.A. On the assesment of the etiologial significance of bacteria detected in the male genital tract. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(4):428–435.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-257>

Введение

При возникновении и развитии патологических процессов различной локализации возрастает роль неспецифических инфекций. Исследователи акцентируют внимание на этиологической значимости условно-патогенных представителей индигенной микрофлоры, отмечая возрастающее значение микробных ассоциаций в патогенезе таких состояний. На фоне накопления информации о микробном разнообразии в генитальном тракте мужчин в норме и при патологии зачастую нерешёнными остаются вопросы расшифровки таксономической принадлежности и диагностической

значимости детектируемых при этом бактерий. Классические бактериологические методы нередко оказываются диагностически несостоятельными, а внедрение в широкую практику новых технологий молекулярно-генетического анализа, исследования белковых профилей возбудителей, хотя и расширило наши представления о видовом спектре бактерий, населяющих организм человека, существенно усложнило понимание как его клинической значимости в целом, так и этиопатогенетического потенциала отдельных представителей. Присутствующие в урогенитальном тракте мужчин многочисленные микроорганизмы, персистируя зачастую длитель-

ное время, могут не вызывать никаких клинических проявлений либо обуславливать вялотекущее малосимптомное воспаление, которое имеет тенденцию распространяться и развиваться не только в уретрит, простатит, эпидидимит, орхит, но и приводить к нарушению процесса сперматогенеза. К тому же условно патогенные «аборигены» этого биотопа способны, с одной стороны, маскироваться под специфических возбудителей, а с другой — влиять на клинические проявления инфекций, передающихся половым путём, а также на течение и результаты лечения, к примеру, генитальной гонококковой инфекции [1, 2]. В качестве регуляторов такого сложного микробного сообщества можно рассматривать полиамины, синтез которых в очаге воспаления существенно усиливается [3]. Эти соединения могут опосредовать свои эффекты без взаимодействия со специфическими рецепторами [4], инактивировать свободные радикалы и регулировать жизнедеятельность не только отдельных бактериальных клеток, но и сообщества в целом [5].

Современный уровень развития лабораторных технологий предлагает широкие возможности для идентификации таксонов, локализованных в биотопах. Складывается впечатление, что могут быть преодолены основные трудности бактериологического метода, обусловленные аутокотрофностью микроорганизмов, наличием анаэробных и некультивируемых форм и др. Так, в качестве альтернативы комплексу традиционных способов идентификации бактерий можно рассматривать метод исследования белковых профилей — времяпролетную масс-спектрометрию с матричной лазерной десорбцией / ионизацией (MALDI-TOF MS). Молекулярно-генетические исследования, основанные на методе амплификации нуклеиновых кислот (полимеразной цепной реакции), рекомендованы для диагностики инфекций, передающихся половым путём [6], и обладают рядом преимуществ по сравнению с традиционными культуральными и микроскопическими методами. ПЦР-тестирование позволяет получить результат за достаточно короткое время, обладает высокой специфичностью и чувствительностью, что особенно важно для выявления хронической инфекции, когда патоген персистирует в низкой концентрации [7]. Кроме того, метод позволяет проводить исследование в количественном формате, что имеет значение для мониторинга эффективности лечения [8]. Однако и MALDI-TOF MS, и молекулярно-генетические технологии не дают ответа на вопрос о жизнеспособности детектируемых микроорганизмов. Кроме того, затруднено получение сведений о чувствительности микроорганизмов к антибиотикам и антисептикам, особенно при проведении массовых исследований, а самая главная проблема клинической микробиологии — оценка этиологической значимости условно-патогенных

бактерий и их ассоциаций — в силу колоссального количества детектируемого генетического материала остаётся нерешённой.

Цель исследования — пересмотр диагностической значимости количественного подхода при определении этиологической роли условно-патогенных микроорганизмов в андрологии с учётом результатов молекулярно-генетического и традиционного бактериологического анализа.

Материалы и методы

Для исследования использовали пробы эякулята и/или отделяемого из уретры 15 мужчин, проходивших обследование по поводу бесплодия в браке, 12 — с подтверждённым в клинической лаборатории диагнозом «острая генитальная гонококковая инфекция» (ОГГИ). Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ПГМУ им. акад. Е.А. Вагнера (протокол № 11 от 11.01.2021).

Концентрацию путресцина в спермальной жидкости определяли методом тонкослойной хроматографии [9, 10].

Для бактериологического анализа исследуемых образцов готовили десятикратное разведение исходного материала. Стрепто- и энтерококки изолировали на кровяном агаре, стафилококки выделяли на желточно-солевом агаре, грибы рода *Candida* — на среде Сабуро, энтеробактерии определяли при высеве на агар Эндо, гонококки — на ГНК агаре (гонококковая среда), анаэробы — на обогащённой среде для контроля стерильности, разлитой по пробиркам «высоким столбиком». Все среды отечественного производства (Махачкала, Оболensk, Пермь). Количество выделенных микроорганизмов выражали в виде Ig КОЕ/мл биологического материала.

Метагеномное исследование 16S рибосомальной РНК образцов осуществлено в отделе коллекционных культур ФБУН ГНЦ ПМБ на платформе «IlluminaMiSeq» с использованием набора «MiSeqReagentKits v3» («600-Cycle Kit») согласно рекомендациям производителя. Библиотеки для секвенирования участков V3–V4 гена 16S рибосомной РНК были приготовлены согласно 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Illumina. При биоинформационной оценке применяли программное обеспечение для метагеномного анализа — «Kraken Metagenomics v.2.0.0» (классификатор ридов — коротких нуклеотидных последовательностей), используя стандартную базу данных. При анализе данных встречаемость ридов менее 1% считали малочисленной, что не позволяет сформировать отдельный кластер, и поэтому в статистический анализ эти данные не вошли.

Для стандартизации распределения образцов по группам с учётом показателей альфа-разно-

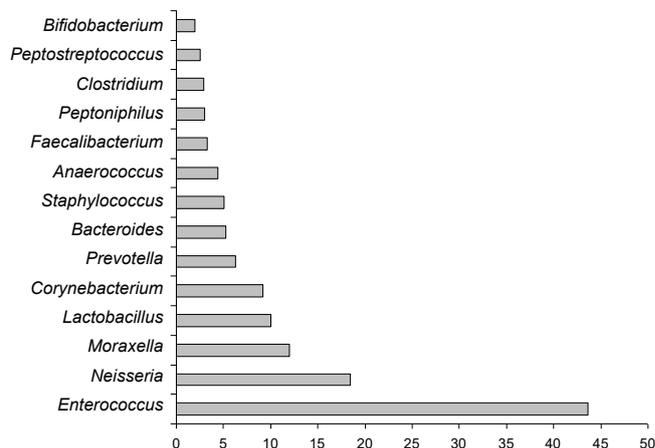
образия и концентрации путресцина использовали размах вариации и среднее линейное отклонение. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием «MS Excel» и пакета «Statistica 7.0». Для проверки нормальности распределения использовали критерий Шапиро–Уилка. В случае распределения, приближенного к нормальному, использовали *t*-критерий Стьюдента, в остальных случаях — критерий Манна–Уитни для оценки значимости различий. За пороговый уровень значимости принимали величину $p < 0,05$.

Результаты

При проведении анализа метагеномных данных установлено, что среднее содержание эукариотической ДНК в образцах — $28,0 \pm 7,4\%$. Коэффициент альфа-разнообразия варьировал от 3 до 82 (среднее арифметическое 19,1; стандартное отклонение 22,0). Микробный пейзаж характеризовался преобладанием представителей родов *Enterococcus*, *Neisseria*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Prevotella*, *Bacteroides* и др. (рисунк). Среди генетического материала прокариотических клеток во всех образцах детектировали фрагменты генома *Enterococcus faecalis* в значительном количестве. Неожиданной находкой явились детектируемые с постоянством генетические маркеры *Moraxella* spp., доля которых в метагеноме превышала 10%. *M. osloensis* занимали среди них лидирующие позиции ($11,7 \pm 9,3\%$). При этом в эякуляте детектировали устойчивые ассоциации *E. faecalis* и *M. osloensis*. В трети таких ассоциаций доминирующее положение занимали *M. osloensis*, а более чем в половине — *E. faecalis*.

При использовании культурального метода представители рода *Moraxella* не были выделены ни в одной пробе. В посевах образцов зачастую регистрировали представителей одного вида, реже — ассоциации 2, менее чем в десятой доле проб — совокупность 3 микроорганизмов. В то же время при молекулярно-генетическом исследовании обнаружен значительно более широкий видовой спектр в каждой пробе. Примечательно, что те виды, которые высевали при культивировании, детектированы и при метагеномном исследовании, но в минимальных количествах, и наоборот, что с трудом поддается логическому объяснению.

Среди мужчин с бесплодием из 3 образцов с относительно низким содержанием бактериальной ДНК (менее 30%) в 2 образцах бактерии не были обнаружены культуральным методом, а при метагеномном исследовании детектированы *M. osloensis*, *Lactobacillus* spp., *Gardnerella vaginalis*, *M. morgani*, *E. faecalis* и ряд других таксонов, представленность которых была менее 0,1% от общей ДНК прокариот. В 8 образцах количество ДНК бактерий, выявленных в бактериологическом исследовании, составляло менее 0,1% метагенома. Содержание ДНК бакте-



Представительство бактерий отдельных родов в эякуляте по результатам метагеномного анализа.

По оси ординат — относительное содержание геномовариантов в образцах (%), по оси абсцисс — доминирующие таксоны микроорганизмов.

Representation of bacteria of certain genera in the ejaculate according to the results of metagenomic analysis.

X-axis shows the relative content of genovariants in the samples (%), Y-axis shows the dominant taxa of microorganisms.

рий, выявленных в оставшихся 4 пробах, составило по метагеному 4–17%. О совпадении результатов можно говорить только в 4 случаях из 15.

Рассмотрим некоторые примеры. В образце № 123 при культуральном исследовании обнаружены *Staphylococcus aureus* (10^5 КОЕ/мл) и *Escherichia coli* (10^6 КОЕ/мл). Метагеномный анализ того же образца показал, что ДНК прокариот представлена на 54% *E. faecalis*, 6% — *M. osloensis*, 4% — *Corynebacterium* spp., 2% — *Lactobacillus* spp. и 11% генетического материала принадлежали совокупности микроорганизмов, каждый из которых детектирован менее чем в 1% родов. Доля *S. aureus* в метагеноме — 0,05%, *E. coli* — 0,07%. Можно полагать, что в данном примере отсутствие роста энтерококков на питательных средах связано с формированием «малых», некультивируемых форм, что, вероятно, обусловлено действием таких внешних факторов, как иммунная система организма-хозяина или антагонистическими взаимоотношениями между микроорганизмами в биотопе. С другой стороны, ростовые свойства *S. aureus* и *E. coli* на традиционно используемых питательных средах существенно выше, чем таковые у энтерококков и, тем более, моракселл, лактобактерий и коринебактерий.

В образце № 93 на питательных средах изолированы только *Enterobacter cloacae* (10^6 КОЕ/мл). При проведении метагеномного исследования установлено, что 75% генетического материала принадлежало эукариотическим клеткам, а среди прокариот 7% — представителям семейства *Enterobacteriaceae* (4% — *E. cloacae*), 6% — *E. faecalis*, 5% — *M. osloe-*

nsis, 1% — *M. morgani*, 0,8% — *Lactobacillus* spp. Оставшиеся 5% представляли совокупность микроорганизмов, доля каждого составляла менее 0,5%. В данном примере прослеживается проблема сопоставления количественных данных культурального и метагеномного исследований: как соотносить 4% обнаруженных ридов, принадлежащих *E. cloacae*, и 10^6 КОЕ/мл в культуральном исследовании?

При исследовании материала от пациентов с ОГГИ, подтверждённой бактериологическим исследованием, генетический материал *Neisseria gonorrhoeae* обнаружен в метагеномном анализе лишь 5 образцов, но в очень незначительном количестве (0,200–0,008%).

Из образца № 15 культуральным методом были изолированы *N. gonorrhoeae*, кроме того в материале обнаружены *Enterobacteriaceae* (10^3 КОЕ/мл) и *Lactobacillus* spp. При проведении метагеномного анализа установлено, что на долю эукариот приходится 76% совокупного генетического материала, что может свидетельствовать об остроте воспалительного процесса, при котором фрагменты генома *N. gonorrhoeae* составили лишь 0,2%, а фрагменты сопутствующих *Lactobacillus* spp. — 3% и *Enterobacteriaceae* — 0,5%. В то же время 29,8% генетического материала бактерий принадлежало другим представителям рода *Neisseria*, в том числе *N. meningitidis*, а также близким по морфологии и культуральным свойствам *Moraxella* spp., не распознанным при бактериологическом анализе.

В образце № 21 традиционным методом обнаружены *N. gonorrhoeae*, *Enterobacteriaceae* (10^4 КОЕ/мл), *Staphylococcus* spp. (10^4 КОЕ/мл) и *Streptococcus* spp. (10^4 КОЕ/мл). При метагеномном исследовании установлено, что доля генетического материала эукариот составляет 70%, среди прокариот доля *Streptococcus* spp. составила 2%, а генетический материал *N. gonorrhoeae* и *Staphylococcus* spp. не обнаружен. Таким образом, в данном образце результаты традиционного и метагеномного исследований по существу противоречили друг другу.

Таким образом, параллельно выполненное исследование образцов материала от пациентов с диагнозом ОГГИ показало, что разночтения могут не

только затрагивать количественные показатели, но и выявлять несоответствия качественной оценки детектированных генетических маркеров с результатами идентификации в бактериологическом исследовании отдельных представителей соимённых и фенотипически сходных таксонов.

На диаграмме рассеивания значений, согласно [11], в зависимости от положения относительно линии тренда показателей коэффициента альфа-разнообразия микроорганизмов и количества путресцина обозначились три группы образцов (таблица). В 1-й группе с низким альфа-разнообразием простатит, установленный по данным УЗИ, встречался у 90% лиц, а во 2-й — у 25% ($p < 0,05$). Третью группу с более высоким показателем альфа-разнообразия составили пациенты с острым воспалительным процессом. Различия между группами статистически значимы, при этом в каждой из них отмечена сильная корреляция между коэффициентом альфа-разнообразия и концентрацией путресцина в спермальной жидкости.

Обсуждение

Наличие достаточно противоречивых результатов при применении традиционного бактериологического и, бесспорно, перспективного молекулярно-генетического методов лабораторного исследования заставляет критически переоценивать диагностическую значимость каждого из них. Не вызывает сомнений, что внедрение в микробиологическую диагностику метагеномного секвенирования 16S рибосомальной РНК существенно расширило наши представления о микробном сообществе организма человека [12]. Установлено, что, к примеру, 80% микроорганизмов кишечника — не культивируемые [13]. В то же время существует проблема оценки этиологической значимости изолированных микроорганизмов. Так, в исследовании [14] сообщается, что методы, основанные на изучении генома, могут «пропускать» клинически значимые таксоны, что было показано для *Salmonella typhi* и *Yersinia enterocolitica*. Эти микроорганизмы, присутствуя в микробном сообществе в меньшинстве, способны обуславливать клинически значимые состояния. Обобщая вклад минорных (по количе-

Средние показатели альфа-разнообразия и количества путресцина в группах образцов

Mean values of alpha diversity and amount of putrescine in groups of samples

Показатель / Parameter	Группа / Group		
	1	2	3
Альфа-разнообразие / Alpha-diversity	6,63 ± 3,28	7,50 ± 1,75	35,80 ± 12,24
Путресцин, ммоль/л / Putrescine, mmol/l	0,069 ± 0,028	0,140 ± 0,005	0,280 ± 0,058
Коэффициент корреляции* / Correlation coefficient*	0,93	0,82	0,88

Примечание. * — коэффициент корреляции между показателями альфа-разнообразия и количеством путресцина.

Note. * — the correlation coefficient between the alpha-diversity index and the amount of putrescine.

ству) популяций микроорганизмов, авторы подчёркивают, что они могут оказывать существенное влияние на экологию биотопа и здоровье человека. J.C. Lagier и соавт. ещё 10 лет назад указывали на то, что и без применения геномных технологий путём расширения возможностей культурального метода за счёт использования селективных добавок, антибиотиков, бактериофагов и т.п. удаётся значительно повышать его эффективность [14]. Так, элиминация только одного вида *E. coli* позволила исследователям идентифицировать в образцах фекалий новый вид энтеробактеров — *Enterobacter massiliensis*. Использование рубцовой жидкости или предварительной инкубации образцов в средах с кровью позволило выделить на 17 культур больше, чем без применения таких процедур [15, 16].

Ранее нами установлено, что в микрофлоре эякулята мужчин доминируют, как правило, антагонистические взаимоотношения между отдельными видами [17]. При этом часть микроорганизмов, находящихся в меньшей численности, но обладающих более выраженным антагонистическим потенциалом, может подавлять патогенетическую активность более вирулентных ассоциантов и менять клиническую картину заболевания, снижая выраженность его острой фазы. Кроме этого, такие взаимоотношения не могут не отразиться на результатах культурального метода исследования. В подобных условиях микроорганизмы изменяют свой фенотип, формируя так называемые «малые формы колоний» [18]. Показано, что при неблагоприятных условиях переход в состояние «малых форм» обеспечивает выживаемость микроорганизмов [19]. Приводятся доказательства, что такая форма является переходной к некультивируемому состоянию [20]. Именно поэтому в настоящем исследовании с помощью культурального метода не удалось детектировать, например, *E. faecalis*, которые, вероятно, находились в таком переходном состоянии.

Результаты настоящего исследования указывают на то, что при меньшем разнообразии у условно-патогенных микроорганизмов больше возможностей для реализации своего патогенного потенциала. С другой стороны, в составе сложного сообщества, когда альфа-разнообразие больше, его реализация затруднена из-за сложных межмикробных отношений, с одной стороны, и необходимостью выживать — с другой. Можно предположить, что, не проявив свои патогенные свойства, микроорганизмы, под давлением со стороны поликомпонентного сообщества, переходят к особому персистентному состоянию, когда их жизнеспособность не нарушается, а влияние на эукариотические клетки нивелировано. Логично и наблюдаемое при большом разнообразии повышение уровня путресцина, который оказывает на микроорганизмы благоприятное действие, способствуя их выживанию, и,

таким образом, обеспечивает персистенцию антагонистических видов в одном биотопе. Кроме этого, выступая как «скавенджер» свободных радикалов, путресцин обуславливает снижение реактивности лейкоцитов, вероятно, обеспечивая таким образом формирование хронического воспалительного процесса при отсутствии острой фазы.

Заключение

В целом внедрение молекулярно-генетических методов в медицинскую микробиологию существенно расширяет представления о микробиоте биотопов человека. Тем не менее отказаться от культурального метода невозможно в силу того, что он позволяет получить информацию о клинически значимых штаммах, оценить их чувствительность к антимикробным средствам, а также косвенно судить о взаимоотношениях между микроорганизмами. Требуется совершенствование культурального метода, расширение его возможностей. Однако общепринятая тактика безоговорочного признания этиопатогеном изолята, количественно преобладающего в образце при культуральном исследовании, выглядит, по меньшей мере, сомнительной. Представляется, что наиболее перспективным следует признать комплексное использование культуромикки и метагеномики с учётом сравнительного статистического анализа получаемых качественных и количественных показателей, в том числе с использованием предлагаемого методического подхода.

Проявление симптомов заболевания зависит от микробного разнообразия биотопа. Логично предположить, что при ограниченном видовом спектре в сложившихся условиях в микробиоте преобладают синергичные взаимоотношения, когда даже при малой численности совокупный патогенный потенциал условно-патогенных бактерий может обусловить выраженный воспалительный процесс. С другой стороны, при большом разнообразии сложные, чаще антагонистические межмикробные отношения препятствуют оппортунистическим видам реализации в полной мере своего патогенного потенциала, даже при высокой их численности, что, вероятно, и становится причиной развития асимптомной вялотекущей инфекции или «здорового» бактерионосительства.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Кубанова А.А., Рахматулина М.Р. Урогенитальные инфекционные заболевания, вызванные генитальными микоплазмами. Клинические рекомендации. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2009; (3): 78–82.
2. Рахматулина М.Р. Урогенитальные заболевания, вызванные генитальными микоплазмами (*Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma spp.*, *Mycoplasma hominis*). *Дерматология. Приложение к журналу Consilium Medicum*. 2012; (2): 22–5.
3. Hesterberg R.S., Cleveland J.L., Epling-Burnette P.K. Role of polyamines in immune cell functions. *Med. Sci. (Basel)*. 2018; 6(1): 22. <https://doi.org/10.3390/medsci6010022>

4. Годовалов А.П., Карпунина Т.И. Микробиологический подход к оценке особенностей микробиоты эякулята в профилактике снижения фертильности. *Профилактическая медицина*. 2020; 23(3): 108–12. <https://doi.org/10.17116/profmed202023031108>
5. Fujisawa S., Kadoma Y. Kinetic evaluation of polyamines as radical scavengers. *Anticancer Res.* 2005; 25(2A): 965–9.
6. Федеральные клинические рекомендации. *Дерматовенерология 2015: Болезни кожи. Инфекции, передаваемые половым путем*. М.: Деловой экспресс; 2016.
7. Гомберг М.А., Гушин А.Е. Хламидийная инфекция в современной гинекологии: основные аспекты профилактики и лечения воспалительных заболеваний органов малого таза. *Гинекология*. 2012; 14(4): 19–22.
8. Muralidhar S. Molecular methods in the laboratory diagnosis of sexually transmitted infections. *Indian J. Sex. Transm. Dis. AIDS*. 2015; 36(1): 9–17. <https://doi.org/10.4103/0253-7184.156686>
9. Ткаченко А.Г., Шумков М.С., Ахова А.В. Путресцин как модулятор содержания σ S-субъединицы РНК-полимеразы в клетках *Escherichia coli* при кислотном стрессе. *Биохимия*. 2006; 71(2): 237–46.
10. Богданов Ю.А., Карпунина Т.И., Нестерова Л.Ю., Ахова А.В. О диагностической значимости содержания полиаминов в эякуляте инфертильных мужчин при асимптомных воспалительных процессах. *Андрология и генитальная хирургия*. 2013; 14(3): 19–22.
11. Демин С.Е., Демина Е.Л. *Математическая статистика*. Нижний Тагил; 2016.
12. Browne H.P., Forster S.C., Anonye B.O., Kumar N., Neville B.A., Stares M.D., et al. Culturing of “unculturable” human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation. *Nature*. 2016; 533(7604): 543–6. <https://doi.org/10.1038/nature17645>
13. Turnbaugh P.J., Ley R.E., Hamady M., Fraser-Liggett C.M., Knight R., Gordon J.I. The human microbiome project. *Nature*. 2007; 449(7164): 804–10. <https://doi.org/10.1038/nature06244>
14. Lagier J.C., Armougom F., Million M., Hugon P., Pagnier I., Robert C., et al. Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012; 18(12): 1185–93. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12023>
15. Goodman A.L., Kallstrom G., Faith J.J., Reyes A., Moore A., Dantas G., et al. Extensive personal human gut microbiota culture collections characterized and manipulated in gnotobiotic mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2011; 108(15): 6252–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102938108>
16. Pagnier I., Raoult D., La Scola B. Isolation and identification of amoeba-resisting bacteria from water in human environment by using an *Acanthamoeba* polyphaga co-culture procedure. *Environ. Microbiol.* 2008; 10(5): 1135–44. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01530.x>
17. Годовалов А.П., Гушин М.О., Карпунина Т.И. Особенности межмикробных отношений в микробиоте влагалища инфертильных женщин. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2019; 14(1-1): 40–44. <https://doi.org/10.14300/mnnc.2019.14045>
18. Fugère A., Lalonde Séguin D., Mitchell G., Déziel E., Dekimpe V., Cantin A.M., et al. Interspecific small molecule interactions between clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* from adult cystic fibrosis patients. *PLoS One*. 2014; 9(1): e86705. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086705>
19. Atalla H., Gyles C., Mallard B. Staphylococcus aureus small colony variants (SCVs) and their role in disease. *Anim. Health Res. Rev.* 2011; 12(1): 33–45. <https://doi.org/10.1017/S1466252311000065>
20. Trizna E.Y., Yarullina M.N., Baidamshina D.R., Mironova A.V., Akhatova F.S., Rozhina E.V., et al. Bidirectional alterations in antibiotics susceptibility in *Staphylococcus aureus* – *Pseudomonas aeruginosa* dual-species biofilm. *Sci. Rep.* 2020; 10(1): 14849. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71834-w>

REFERENCES

1. Kubanova A.A., Rakhmatulina M.R. Urinogenetal infectious diseases caused by genital mycoplasma. Clinical recommendations. *Vestnik dermatologii i venerologii*. 2009; (3): 78–82. (in Russian)
2. Rakhmatulina M.R. Urogenital diseases caused by genital mycoplasmas (*Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma spp.*, *Mycoplasma hominis*). *Dermatology. Consilium Medicum*. 2012; (2): 22–5. (in Russian)
3. Hesterberg R.S., Cleveland J.L., Epling-Burnette P.K. Role of polyamines in immune cell functions. *Med. Sci. (Basel)*. 2018; 6(1): 22. <https://doi.org/10.3390/medsci6010022>
4. Godovalov A.P., Karpunina T.I. Microecological approach to assessing the characteristics of the ejaculate microbiota in the prevention of fertility decline. *Profilakticheskaya meditsina*. 2020; 23(3): 108–12. <https://doi.org/10.17116/profmed202023031108> (in Russian)
5. Fujisawa S., Kadoma Y. Kinetic evaluation of polyamines as radical scavengers. *Anticancer Res.* 2005; 25(2A): 965–9.
6. Federal clinical guidelines. *Dermatovenerology 2015: Skin diseases. Sexually transmitted infections*. Moscow: Delovoy ekspress; 2016. (in Russian)
7. Gomberg M.A., Gushchin A.E. Chlamydial infection in modern gynecology: the main aspects of prophylaxis and treatment of pelvic inflammatory diseases. *Ginekologiya*. 2012; 14(4): 19–22. (in Russian)
8. Muralidhar S. Molecular methods in the laboratory diagnosis of sexually transmitted infections. *Indian J. Sex. Transm. Dis. AIDS*. 2015; 36(1): 9–17. <https://doi.org/10.4103/0253-7184.156686>
9. Tkachenko A.G., Shumkov M.S., Akhova A.V. Putrescine as a modulator of the level of RNA polymerase σ S subunit in *Escherichia coli* cells under acid stress. *Biokhimiya*. 2006; 71(2): 185–93.
10. Bogdanov Yu.A., Karpunina T.I., Nesterova L.Yu., Akhova A.V. On the diagnostic significance of polyamines in semen of infertile men with asymptomatic inflammation. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya*. 2013; 14(3): 19–22. (in Russian)
11. Demin S.E., Demina E.L. *Mathematical Statistics [Matematicheskaya statistika]*. Nizhnyy Tagil; 2016. (in Russian)
12. Browne H.P., Forster S.C., Anonye B.O., Kumar N., Neville B.A., Stares M.D., et al. Culturing of “unculturable” human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation. *Nature*. 2016; 533(7604): 543–6. <https://doi.org/10.1038/nature17645>
13. Turnbaugh P.J., Ley R.E., Hamady M., Fraser-Liggett C.M., Knight R., Gordon J.I. The human microbiome project. *Nature*. 2007; 449(7164): 804–10. <https://doi.org/10.1038/nature06244>
14. Lagier J.C., Armougom F., Million M., Hugon P., Pagnier I., Robert C., et al. Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012; 18(12): 1185–93. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12023>
15. Goodman A.L., Kallstrom G., Faith J.J., Reyes A., Moore A., Dantas G., et al. Extensive personal human gut microbiota culture collections characterized and manipulated in gnotobiotic mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2011; 108(15): 6252–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102938108>
16. Pagnier I., Raoult D., La Scola B. Isolation and identification of amoeba-resisting bacteria from water in human environment by using an *Acanthamoeba* polyphaga co-culture procedure. *Environ. Microbiol.* 2008; 10(5): 1135–44. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01530.x>
17. Godovalov A.P., Gushchin M.O., Karpunina T.I. Features of inter-microbial relations in the infertile women’s vagina microbiota. *Meditsinskiy vestnik Severnogo Kavkaza*. 2019; 14(1-1): 40–44. <https://doi.org/10.14300/mnnc.2019.14045> (in Russian)

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

18. Fugère A., Lalonde Séguin D., Mitchell G., Déziel E., Dekimpe V., Cantin A.M., et al. Interspecific small molecule interactions between clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* from adult cystic fibrosis patients. *PLoS One*. 2014; 9(1): e86705. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086705>
19. Atalla H., Gyles C., Mallard B. *Staphylococcus aureus* small colony variants (SCVs) and their role in disease. *Anim. Health Res. Rev.* 2011; 12(1): 33–45. <https://doi.org/10.1017/S1466252311000065>

Информация об авторах

Годовалов Анатолий Петрович[✉] — к.м.н., в.н.с. ЦНИЛ, доц. каф. микробиологии и вирусологии ПГМУ им. акад. Е.А. Вагнера, Пермь, Россия, agodovalov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5112-2003>

Николаева Нина Владимировна — к.б.н., доц. каф. микробиологии и вирусологии ПГМУ им. акад. Е.А. Вагнера, Пермь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6799-5503>

Карпунина Тамара Исаковна — д.б.н., проф. каф. микробиологии и вирусологии ПГМУ им. акад. Е.А. Вагнера, Пермь, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2511-4656>

Оборин Денис Александрович — врач-бактериолог, Пермский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, Пермь, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6426-5217>

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

Статья поступила в редакцию 19.03.2022;
принята к публикации 25.06.2022;
опубликована 30.08.2022

20. Trizna E.Y., Yarullina M.N., Baidamshina D.R., Mironova A.V., Akhatova F.S., Rozhina E.V., et al. Bidirectional alterations in antibiotics susceptibility in *Staphylococcus aureus* – *Pseudomonas aeruginosa* dual-species biofilm. *Sci. Rep.* 2020; 10(1): 14849. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71834-w>

Information about the authors

Anatoliy P. Godovalov[✉] — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Central scientific research laboratory, Assoc. Prof., Microbiology and virology department, E.A. Vagner Perm State Medical University, Perm, Russia, agodovalov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5112-2003>

Nina V. Nikolaeva — Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Microbiology and virology department, E.A. Vagner Perm State Medical University, Perm, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6799-5503>

Tamara I. Karpunina — D. Sci. (Biol.), Professor, Microbiology and virology department, E.A. Vagner Perm State Medical University, Perm, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2511-4656>

Denis A. Oborin — bacteriologist, Perm Regional Center for the Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases, Perm, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6426-5217>

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

The article was submitted 19.03.2022;
accepted for publication 25.06.2022;
published 30.08.2022

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-237>

Оценка наличия генов, связанных с вирулентностью, у изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из микробиоты больных и «практически» здоровых людей, с применением метода мультиплексной полимеразной цепной реакции

Пай Г.В.¹, Ракитина Д.В.¹, Сухина М.А.^{1,2}, Юдин С.М.¹, Макаров В.В.¹, Мания Т.Р.^{1*}, Загайнова А.В.¹

¹Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью ФМБА, Москва, Россия;

²Национальный медицинский исследовательский центр колопроктологии имени А.Н. Рыжих, Москва, Россия

Аннотация

Введение. *Klebsiella pneumoniae* в микробиоте человека может быть представлена как комменсальными, так и высокопатогенными штаммами, например, с гипермукоидным фенотипом. Данный фенотип характеризуется определёнными генетическими детерминантами, позволяющими выявить патогенный потенциал изолятов молекулярно-генетическим методом ПЦР.

Цели и задачи: сравнить патогенный потенциал изолятов *K. pneumoniae*, полученных от «практически» здоровых лиц, пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК), и штаммов, выделенных из биологического материала с внекишечными инфекциями (ВКИ), посредством детекции генов, связанных с вирулентностью.

Материалы и методы. Исследование проводили с применением набора олигонуклеотидов для мультиплексного анализа — 8 генов, предположительно ассоциированных с вирулентностью, с функцией захвата железа (*ybtS*, *kfu*, *iutA*), адгезии и инвазии (*mrkD*), гипермукоидного фенотипа и вирулентных штаммов (*mrkD*, *magA*, *rmpA*, *k2*) и метаболизма аллантаина — продукта расщепления пуринов и мочевой кислоты (*allS*). Анализу подвергли 69 изолятов, выделенных из микробиоты кишечника пациентов с ВЗК, 68 изолятов из кишечной микробиоты «практически» здоровых людей и 25 мультирезистентных изолятов, выделенных из крови, мочи, операционных ран, бронхоальвеолярного лаважа пациентов с ВКИ.

Результаты. Установлено, что 4 из 8 исследованных генов были ассоциированы с различными болезненными состояниями, диагностируемыми у пациентов. Ген сидерофора *ybtS* достоверно чаще встречался у изолятов, выделенных как у больных с ВЗК ($p = 0,024$), так и с мультирезистентными ВКИ ($p < 0,001$). У изолятов ВЗК также достоверно чаще представлен ген гипермукоидного фенотипа *rmpA* ($p = 0,038$). У мультирезистентных внекишечных изолятов наиболее достоверно представлены адгезин *mrkD* ($p \leq 0,001$) и *allS* ($p = 0,032$).

Заключение. Изоляты *K. pneumoniae* от пациентов с ВКИ имели наибольший патогенный потенциал, а изоляты из кала «практически» здоровых лиц — наименьший. Наиболее часто встречающиеся гены вирулентности связаны с адгезией и гипермукоидным фенотипом.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, гипермукоидный фенотип, *allS*, *ybtS*, *rmpA*, ВЗК, внекишечные *Klebsiella pneumoniae*

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Локальным независимым этическим комитетом ГНЦК им. А.Н. Рыжих (протокол № 98А от 16.07.2018).

Источник финансирования. Исследование проводилось при поддержке Государственного задания № ААА-А-18-118020590091-2, тема «Разработка технологий криоконсервации и архивирования биобразцов микробиологических ресурсов человека».

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

Для цитирования: Пай Г.В., Ракитина Д.В., Сухина М.А., Юдин С.М., Макаров В.В., Мания Т.Р., Загайнова А.В. Оценка наличия генов, связанных с вирулентностью, у изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из микробиоты больных и «практически» здоровых людей, с применением метода мультиплексной полимеразной цепной реакции. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(4):436–444.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-237>

Multiplex PCR screening for virulence genes of *Klebsiella pneumoniae* isolated from microbiota of diseased and healthy people

Galina V. Pay¹, Daria V. Rakitina¹, Marina A. Sukhina^{1,2}, Sergey M. Yudin¹, Valentin V. Makarov¹, Tamari R. Maniya^{1✉}, Angelika V. Zagaynova¹

¹Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risk of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia;

²State Scientific Center of Coloproctology, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. *Klebsiella pneumoniae* in human microbiota may appear as a part of commensal microbiota, and as hypervirulent pathogen, for example, hypermucoid pathotype. This pathotype is characterized by certain genetic determinants, leading to the possibility of detecting the pathogenic potential of isolates by PCR.

Aim of the study: to evaluate and compare pathogenic potential of *K. pneumoniae* isolates from practically healthy people, patients with inflammatory bowel disease (IBD) and extraintestinal infections (ExII).

Materials and methods. Testing was performed with the set of nucleotides for multiplex PCR analysis targeting eight potentially virulent genes with the following functions: ferrum uptake (*ybsT*, *kfu*, *iutA*), adhesion and invasion (*mrkD*), hypermucoid phenotype and virulent serotypes (*mrkD*, *magA*, *mpaA*, *k2*) and metabolism of allantoin (*allS*). PCR assay was used to screen *Klebsiella pneumoniae* isolates from feces of patients with IBD (69 isolates) and of practically healthy people (68 isolates), and multiresistant isolates from biological material (blood, urine, surgical wounds, bronchoalveolar lavage) of patients with extraintestinal infections (mrExII, 25 isolates).

Results. Results of the testing demonstrated association of four of targeted determinants with the patients diagnoses. *YbtS* gene was significantly more often found in isolates from IBD ($p = 0.024$) and mrExII ($p < 0.001$) groups. *RmpA* gene was significantly more often detected in IBD group ($p = 0.038$). Extraintestinal infectious isolates were significantly ($p \leq 0.001$) enriched with *mrkD* and *allS* genes ($p = 0.032$).

Conclusion. The most potentially virulent group was isolated from patients with extraintestinal infections, the least virulent — isolates from feces of practically healthy people. The most frequently detected virulence genes were involved in adhesion and hypermucoid phenotype formation.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, hypermucoid phenotype, allantoin metabolism, siderophore, IBD, extraintestinal *Klebsiella pneumoniae*

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Local Ethics Committee of the State Scientific Center of Coloproctology (protocol No. 98A, July 16, 2018).

Funding source. The research was carried out with the support of the State Assignment № AAAA-A18-118020590091-2, theme "Development of technologies for cryopreservation and archiving of biological samples of human microecological resources".

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

For citation: Pay G.V., Rakitina D.V., Sukhina M.A., Yudin S.M., Makarov V.V., Maniya T.R., Zagaynova A.V. Multiplex PCR screening for virulence genes of *Klebsiella pneumoniae* isolated from microbiota of diseased and healthy people. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(4):436–444. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-237>

Введение

Klebsiella pneumoniae является представителем нормальной резидентной микрофлоры верхних дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта у «практически» здоровых людей [1]. С другой стороны, *K. pneumoniae* является клинически значимым условно-патогенным микроорганизмом и может попадать в организм человека как из внешней среды (в том числе с водой), так и в условиях внутрибольничного инфицирования [1–3]. *K. pneumoniae* способна поражать различные системы и органы при пневмониях, менингитах, инфекциях мочеполовых путей, абсцессах и инфекциях ран [4, 5]. Описан ряд слу-

чаев, когда *K. pneumoniae* вызывала эпидемические вспышки [6, 7]. В последнее время предполагается участие *K. pneumoniae* в патогенезе различных воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК) [8, 9].

Поскольку *K. pneumoniae* может быть как частью нормальной микрофлоры кишечника, так и инфекционным агентом, для диагностики и лечения встаёт вопрос об участии в патогенезе заболевания конкретного изолята, выделенного от пациента. Патогенность *K. pneumoniae* может быть обусловлена различными факторами, обеспечивающими защиту от атаки иммунной системы организма, способность к адгезии и инвазии в клетки хозяина, выработку ток-

синов, а также устойчивость к антибиотикам [10–12]. Система поглощения железа, включающая секрецию сидерофоров (белков и пептидов, ответственных за захват и импорт ионов железа), также способна внести вклад в патогенез, индуцируя воспаление и усиленный бактериальный рост [13].

В последние годы выделяют определённый патотип гипервирулентных бактерий *K. pneumoniae* (hvKp). Изоляты клебсиелл, относящиеся к hvKp, способны вызывать кишечные и внекишечные поражения (загрывающие печень, лёгкие, мочеполовые пути и т.д.) и распространяются как в обществе, так и в качестве госпитальных инфекций [10, 14].

Определяющим фенотипическим признаком hvKp является гипермукоидный фенотип. Он легко выявляется «нитевым тестом»: колония бактерий на агаровой чашке может быть растянута инокуляционной петлей как минимум на 5 мм [15].

Другими признаками hvKp считаются устойчивость к антибиотикам [16], повышенный биосинтез полисахаридов бактериальной капсулы [17] и специфические серотипы бактериальной капсулы, а также повышенная продукция определённых сидерофоров [18]. Все эти признаки связаны с определёнными генами, находящимися как в плазмидах вирулентности, так и в мобильных элементах, интегрированных в геном бактерии [17]. Таким образом, по крайней мере предварительно, вирулентность бактерии может быть оценена не микробиологическими, биохимическими методами и тестами на животных, а методом генетического анализа с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР). Выявление корректных генов-мишеней у микроорганизмов необходимо для разработки диагностических наборов, планируемых для использования в клинических лабораториях, при эпидемиологическом мониторинге и в научных исследованиях.

Цель работы — оценить патогенный потенциал изолятов *K. pneumoniae*, изолированных от «практически» здоровых лиц, пациентов с ВЗК, и штаммов, выделенных из биологического материала пациентов с внекишечными инфекциями (ВКИ) посредством детекции генов, связанных с вирулентностью.

Материалы и методы

Исследование проводили с применением набора олигонуклеотидов для мультиплексного анализа, предложенного F. Comrain и соавт. [19], — 8 генов, предположительно ассоциированных с вирулентностью, с функцией захвата железа (3 гена), адгезии и инвазии (3 гена), вирулентного серотипа и метаболизма аллантаина (продукта расщепления пуринов и мочевой кислоты).

Изоляты и пациенты

Бактериальные изоляты получены из музейной коллекции Центра стратегического планирования

ФМБА России. Изоляты *K. pneumoniae* были выделены культуральным методом на плотных дифференциальных средах Эндо («HiMedia»), Агар ВСР («Conda»), Chromocult Conform Agar («Merck») из кала 69 пациентов с ВЗК и 68 «практически» здоровых людей (без жалоб на проблемы с желудочно-кишечным трактом). Изучены также 25 штаммов из раневых поверхностей, крови, мочи и бронхоальвеолярного лаважа от пациентов с мультирезистентными ВКИ (мрВКИ) со множественной устойчивостью к антибиотикам, предоставленные НМНИЦ колопроктологии им. А.Н. Рыжих.

Видовую идентификацию изолятов проводили методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролётной масс-спектрометрией (MALDI-TOF MS) на анализаторе «Microflex MALDI-TOF MS» («Bruker Daltonics GmbH & Co. KG») с использованием базы бактериальных белковых спектров и программного обеспечения «MALDI Biotyper» («Bruker Daltonics GmbH & Co. KG»). Идентификацию проводили согласно протоколу производителя, достоверным считали результат с Z-score > 2.

Критерии включения пациентов для группы ВЗК:

- возраст старше 18 лет;
- диагностированное гастроэнтерологом ВЗК (язвенный колит или болезнь Крона);
- отсутствие антибиотикотерапии в течение последних 3 мес.

Критерии включения пациентов для группы практически здоровых людей:

- возраст старше 18 лет;
- отсутствие жалоб на здоровье в области желудочно-кишечного тракта;
- нормальный стул;
- отсутствие антибиотикотерапии в течение последних 3 мес.

У всех пациентов было получено добровольное информированное согласие на сбор материала и проведение исследования. Протокол исследования одобрено Локальным независимым этическим комитетом (протокол № 98А заседания Локального независимого этического комитета ФГБУ «ГНЦК им. А.Н. Рыжих» от 16.07.2018).

Все выделенные изоляты *K. pneumoniae* хранятся в рабочей коллекции ЦСП ФМБА в среде для длительного хранения живых бактериальных клеток при -70°C^1 .

Выделение ДНК

Культивированные бактериальные клетки промывали стерильным физиологическим раствором, собирали центрифугированием, ресуспендировали в стерильном физрастворе и лизировали прогрева-

¹ Патент на изобретение № 2019128097 от 06.09.2019.

нием при 70°C в течение 15 мин. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 6000 об/мин, а надосадочную жидкость, содержащую бактериальную ДНК, использовали для постановки ПЦР.

ПЦР-анализ

ПЦР-анализ проводили на приборе «Bio-Rad Thermal Cycler T100» («Bio-Rad Laboratories, Inc.») с использованием синтетических олигонуклеотидов, предложенных F. Comrain и соавт. [19], для мультиплексного анализа (табл. 1) и реактивов набора для ПЦР с Taq-полимеразой (PK114, «Евроген») согласно протоколу производителя.

Условия реакции: 15 мин при 95°C, 30 циклов (95°C 30 с, 60°C 90 с, 72°C 60 с), финальная стадия элонгации 72°C 10 мин [19].

Продукты реакции детектировали методом электрофореза в 1,2% агарозном геле на трис-борат-ЭДТА буфере с окрашиванием бромистым этидием. Детекцию производили с помощью системы «BioRad Gel-detection» («Bio-Rad Laboratories, Inc.»).

Статистический анализ

Анализ статистической достоверности различий представленности генов *K. pneumoniae*, связанных с вирулентностью, между группами изолятов проводили с помощью программного обеспечения «Statistica» («Statsoft») методом критерия согласия Пирсона (χ^2) [20].

Результаты

Результаты исследования наличия генов-мишеней у выборки из 69 изолятов от больных ВЗК, 68 изолята из кала «практически» здоровых людей и 25 изолятов от пациентов с ВКИ приведены на рисунке.

Статистические различия между группами изолятов, выделенных от больных с ВЗК, ВКИ, обусловленными *K. pneumoniae* и группой изолятов, выделенных от «практически» здоровых лиц, представлены в табл. 2.

Ген сидерофора *ybtS* обнаруживался в изучаемых группах с достоверно различной частотой — у 88% изолятов мрВКИ, у 46,4% ВЗК и ещё реже у изолятов от «практически» здоровых — 26,5%. Отвечающий за транспорт железа ген *kfu* выявлялся во всех исследуемых группах без статистически значимых отличий (8–13% изолятов). Сидерофор *iutA* не выявлен у мрВКИ и найден всего у 1,4% ВЗК, в то же время обнаруживается у 7,4% здоровых изолятов из кала.

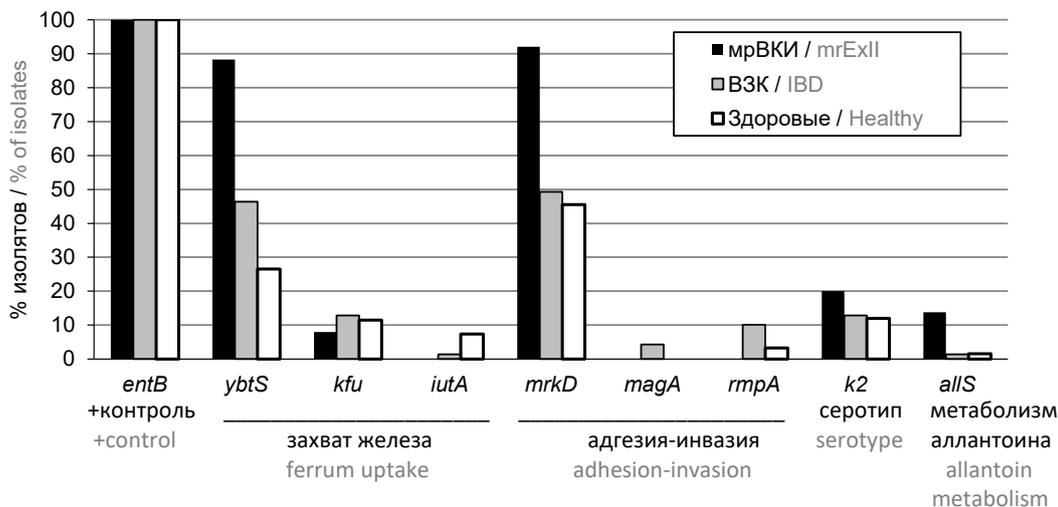
Ген *mrkD*, кодирующий фимбриальный адгезин 3-го типа, обеспечивающий прикрепление клебсиелл к целому ряду тканей человека, выявлен у ~49,3% изолятов ВЗК, у 45,5% здоровых и у 92% изолятов ВКИ.

Ген *k2*, ассоциированный с K2-серотипом бактериальной капсулы, встречался во всех исследуемых группах изолятов из кала — как здоровых, так и ВЗК и мрВКИ, без статистических различий.

Таблица 1. Используемые в работе последовательности для синтетических олигонуклеотидов

Table 1. Specific oligonucleotides sequences used in PCR assay

Ген-мишень ПЦР Target gene	Функция белка — продукта гена-мишени Function of protein — product of target gene	Название олигонуклеотида Oligonucleotide title	Последовательность олигонуклеотида Oligonucleotide sequence
<i>entB</i>	Сидерофор Siderophore	<i>entB_for</i> <i>entB_rev</i>	GTC AAC TGG GCC TTT GAG CCG TC TAT GGG CGT AAA CGC CGG TGA T
<i>ybtS</i>	Сидерофор Siderophore	<i>ybtS_for</i> <i>ybtS_rev</i>	GAC GGA AAC AGC ACG GTA AA GAG CAT AAT AAG GCG AAA GA
<i>kfu</i>	Транспорт железа и функция фосфотрансферазы Iron transport and phosphotransferase function	<i>kfu_for</i> <i>kfu_rev</i>	GGC CTT TGT CCA GAG CTA CG GGG TCT GGC GCA GAG TAT GC
<i>iutA</i>	Сидерофор Siderophore	<i>iutA_for</i> <i>iutA_rev</i>	GGG AAA GGC TTC TCT GCC AT TTA TTC GCC ACC ACG CTC TT
<i>mrkD</i>	Адгезин 3-го типа Adhesin 3 type	<i>mrkD_for</i> <i>mrkD_rev</i>	AAG CTA TCG CTG TAC TTC CGG CA GGC GTT GGC GCT CAG ATA GG
<i>magA</i>	Ассоциирован с K1-серотипом и гипермукоидным фенотипом Associated with K1 serotype and hypermucooid phenotype	<i>magA_for</i> <i>magA_rev</i>	GGT GCT CTT TAC ATC ATT GC GCAATG GCC ATT TGC GTT AG
<i>rmpA</i>	Ген гипермукоидного фенотипа Hypermucooid phenotype gene	<i>rmpA_for</i> <i>rmpA_rev</i>	CAT AAG AGT ATT GGT TGA CAG CTT GCA TGA GCC ATC TTT CA
<i>k2</i>	K2-серотип капсулы K2 capsule serotype	<i>K2_for</i> <i>K2_rev</i>	CAA CCA TGG TGG TCG ATT AG TGG TAG CCA TAT CCC TTT GG
<i>allS</i>	Метаболизм аллантаина Allantoine metabolism	<i>allS_for</i> <i>allS_rev</i>	CAT TAC GCA CCT TTG TCA GC GAA TGT GTC GGC GAT CAG CTT



Доля изолятов, выделенных из кала «практически» здоровых людей, больных ВЗК и ВКИ, содержащих потенциально опасные гены *K. pneumoniae*.

Ген *entB* использовался как положительный контроль прохождения реакции и выявлялся во всех исследуемых образцах.

Percentage of *K. pneumoniae* isolates with potentially virulent genes from healthy people, IBD patients and multiresistant ExII isolates.

EntB gene was used as a positive control of reaction and was present in all studied isolates.

Ген, связанный с гипермукоидным фенотипом *K. pneumoniae* (*rmpA*), не обнаружен во внекишечных изолятах, а среди кишечных чаще встречается у изолятов, выделенных из ВЗК (10,1%). Хромосомный ген *magA*, ассоциированный с гипермукоидным фенотипом, встречается только у ВЗК-изолятов (4,3% из выборки).

Интересно, что ген *allS* достоверно чаще ($\chi^2 = 4,9$; $p = 0,032$) встречался в группе внекишечных изолятов (13,8% в сравнении с 1,4–1,6 у изолятов, выделенных из кала).

Обсуждение

Из 4 изученных генов сидерофоров только *ybtS* показал значимые отличия для исследуемых групп. Он достоверно чаще встречался у изолятов, выделенных от больных с ВЗК ($p = 0,024$) и мрВКИ ($p < 0,001$), в сравнении с изолятами, выделенными у «практически» здоровых людей. Основная функция сидерофоров заключается в переводе железа, связанного с белками или водонерастворимыми

соединениями, в доступную для микроорганизмов ионную форму Fe^{3+} . Большинство аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов синтезируют хотя бы один сидерофор. В ряде исследований также выявлена связь сидерофоров с вирулентностью микроорганизмов [13].

Ген гипермукоидного фенотипа *rmpA* достоверно ($p = 0,038$) чаще встречался у изолятов, выделенных из кала пациентов с ВЗК, отличая эту группу как от группы обследованных «практически» здоровых, так и от пациентов с мрВКИ. Действительно, инвазивные способности *hvkp* считаются ассоциированными с гипермукоидностью — способностью формировать мукоидную нить повышенной длины (более 5 мм) и вязкости. Ген *rmpA* регулирует синтез внеклеточных полисахаридов, а ген *magA* отвечает за полимеризацию капсулы [21, 22]. Обнаружение этих генов только у бактерий, изолированных из кала больных, может быть связано с тем, что гипермукоидный фенотип предоставляет преимущества в случае колонизации

Таблица 2. Результаты статистического анализа данных методом критерия согласия Пирсона (χ^2)

Table 2. Statistical evaluation of PCR assay results by Pearson's χ^2 test

Сравниваемые группы Compared groups	Исследуемые гены / Target genes						
	<i>ybtS</i>	<i>magA</i>	<i>rmpA</i>	<i>mrkD</i>	<i>allS</i>	<i>K2</i>	<i>iutA</i>
ВЗК/«практически» здоровые IBD/"practically healthy"	$\chi^2 = 5,8$ ($p < 0,05$) $p = 0,024$	$\chi^2 = 2,5$ ($p > 0,05$)	$\chi^2 = 4,6$ ($p < 0,05$) $p = 0,038$	$\chi^2 = 0,025$ ($p > 0,05$)	$\chi^2 = 0,004$ ($p > 0,05$)	$\chi^2 = 0,004$ ($p > 0,05$)	$\chi^2 = 3,17$ ($p > 0,05$)
мрВКИ/«практически» здоровые mrExII/"practically healthy"	$\chi^2 = 28,2$ ($p < 0,01$) $p < 0,001$	$\chi^2 = 0$ ($p > 0,05$)	$\chi^2 = 0,787$ ($p > 0,05$)	$\chi^2 = 16,2$ ($p < 0,01$) $p < 0,001$	$\chi^2 = 4,9$ ($p < 0,05$) $p = 0,032$	$\chi^2 = 0,865$ ($p > 0,05$)	$\chi^2 = 2,036$ ($p > 0,05$)

Примечание. Для гена *kfu* не выявлено статистически значимых отличий между исследуемыми группами.

Note. For *kfu* gene no statistical difference was found between the studied groups.

на слизистых поверхностях. Ряд исследователей предполагают, что колонизация кишечника — это обязательная первичная стадия инфицирования организма, даже если инфекция проявляется в иных локализациях [23, 24]. С кишечной колонизацией связывают также предполагаемые пути эпидемического распространения *hvkp* [25]. Есть сообщения о более частой встречаемости гена *rmpA* у кишечных изолятов в сравнении с внекишечными (в том числе из мочи и мазков слизистой оболочки зева) [26]. С другой стороны, имеются исследования, в которых показано наличие связи гена *rmpA* именно с ВКИ и системной инфекцией [27].

При анализе генов, чаще встречающихся у мультирезистентных штаммов от больных с мрВКИ, выявлены 3 гена, статистически чаще встречающиеся у изолятов данной группы больных в сравнении с «практически» здоровыми: *ybtS* ($p < 0,001$), *mrkD* ($p < 0,001$) и *allS* ($p < 0,05$). Об ассоциированности сидерофоров и генов метаболизма аллантаина с мультирезистентностью гипермукоидных клебсиелл, выделенных в России, сообщалось ранее [28, 29].

Ген *mrkD* [30] функционирует как адгезин 3-го типа, участвуя в образовании биоплёнки на покрытых коллагеном поверхностях, в том числе внеклеточном матриксе клеток бронхиального эпителия. Показана его ассоциация с госпитальными инфекциями, в особенности верхних дыхательных путей [31].

Ген *allS* (регулирующий метаболизм аллантаина), который достоверно чаще ($p = 0,032$) встречался в группе внекишечных изолятов, по данным литературы, также более распространён во внекишечных штаммах *K. pneumoniae*, чем в остальных [32–34]. Он входит в состав оперона, отвечающего за метаболизм аллантаина. Продукты этих генов обеспечивают усвоение азота из экзогенного аллантаина, продукта катаболизма пуринов. Этот оперон обнаруживается и у других инфекционных представителей бактерий семейства *Enterobacteriaceae* (*Salmonella typhimurium* [35], *Escherichia coli* [36]). Генетический анализ данного оперона позволяет предположить, что он может являться «островком патогенности», мобильным вирулентным элементом генома. Непосредственная функция данных генов в патогенезе не ясна, предполагается, что они важны при распространении инфекции из желудочно-кишечного тракта в печень и иные внекишечные локализации [34].

Заключение

Применение метода мультиплексной ПЦР для анализа генов, потенциально отвечающих за вирулентность и патогенность штаммов *K. pneumoniae*, показало ассоциацию 4 из 8 исследованных генов, связанных с болезненными состояниями пациентов, которые, по-видимому, обеспечивают преиму-

щество перед другими видами микроорганизмов микробиоты человека и могут влиять на развитие патологического процесса. Это может иметь значение как для врачей-клиницистов, так и для врачей-эпидемиологов.

Ген сидерофора *ybtS* достоверно чаще встречался у изолятов, полученных из биологического материала от больных как ВЗК, так и с мрВКИ. У изолятов, выделенных из кала у пациентов с ВЗК, также достоверно чаще представлен ген гипермукоидного фенотипа *rmpA*. У внекишечных изолятов наиболее достоверно представлены 2 гена из изученных: адгезин 3-го типа *mrkD* и ген, отвечающий за метаболизм аллантаина, *allS*.

Таким образом, при изучении наличия генов, предположительно ассоциированных с патогенностью, у изолятов *K. pneumoniae*, выделенных из микробиоты больных и «практически» здоровых людей с применением метода мультиплексной ПЦР, получены достоверные результаты, показывающие, что наличие у изолятов *K. pneumoniae* генов *ybtS* и *rmpA* может быть ассоциировано с ВЗК, а наличие у *K. pneumoniae* генов *ybtS*, *mrkD* и *allS* — с возникновением внекишечных заболеваний, в том числе сепсиса.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Bagley S.T. Habitat association of *Klebsiella* species. *Infect. Control.* 1985; 6(2): 52–8. <https://doi.org/10.1017/S0195941700062603>
2. Jarvis W.R., Munn V.P., Highsmith A.K., Culver D.H., Hughes J.M. The epidemiology of nosocomial infections caused by *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Control.* 1985; 6(2): 68–74. <https://doi.org/10.1017/s0195941700062639>
3. Marchaim D., Chopra T., Pogue J.M., Perez F., Hujer A.M., Rudin S., et al. Outbreak of colistin-resistant, carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in metropolitan Detroit, Michigan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011; 55(2): 593–9. <https://doi.org/10.1128/AAC.01020-10>
4. Komisarova E.V., Volozhantsev N.V. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: a new infectious threat. 2019; 17(3): 81–9. <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2019-3-81-89>
5. Khaertynov K.S., Anokhin V.A., Davidyuk Y.N., Nicolaeva I.V., Khalioullina S.V., Semyenova D.R., et al. Case of meningitis in a neonate caused by an extended-spectrum-beta-lactamase-producing strain of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Microbiol.* 2017; 8: 1576. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01576>
6. Frazee B.W., Hansen S., Lambert L. Invasive infection with hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae*: multiple cases presenting to a single emergency department in the United States. *Ann. Emerg. Med.* 2009; 53(5): 639–42. <https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2008.11.007>
7. McCabe R., Lambert L., Frazee B. Invasive *Klebsiella pneumoniae* infections, California, USA. *Emerg. Infect. Dis.* 2010; 16(9): 1490–1. <https://doi.org/10.3201/eid1609.100386>
8. Kaur C.P., Vadivelu J., Chandramathi S. Impact of *Klebsiella pneumoniae* in lower gastrointestinal tract diseases. *J. Dig. Dis.* 2018; 19(5): 262–71. <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12595>
9. Atarashi K., Suda W., Luo C., Kawaguchi T., Motoo I., Narushima S., et al. Ectopic colonization of oral bacteria in the intestine drives TH1 cell induction and inflammation. *Science.*

- 2017; 358(6361): 359–65.
<https://doi.org/10.1126/science.aan4526>
10. Choby J.E., Howard-Anderson J., Weiss D.S. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* — clinical and molecular perspectives (Review). *J. Intern. Med.* 2020; 287(3): 283–300.
<https://doi.org/10.1111/joim.13007>
 11. Jian-Li W., Yuan-Yuan S., Shou-Yu G., Fei-Fei D., Jia-Yu Y., Xue-Hua W., et al. Serotype and virulence genes of *Klebsiella pneumoniae* isolated from mink and its pathogenesis in mice and mink. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 17291.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-17681-8>
 12. Turton J.F., Payne Z., Coward A., Hopkins K.L., Turton J.A., Doumith M., et al. Virulence genes in isolates of *Klebsiella pneumoniae* from the UK during 2016, including among carbapenemase gene-positive hypervirulent K1-ST23 and 'non-hypervirulent' types ST147, ST15 and ST383. *J. Med. Microbiol.* 2018; 67(1): 118–28. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000653>
 13. Holden V.I., Breen P., Houle S., Dozois C.M., Bachman M.A. *Klebsiella pneumoniae* siderophores induce inflammation, bacterial dissemination, and HIF-1 α stabilization during pneumonia. *mBio.* 2016; 7(5): e01397-16.
<https://doi.org/10.1128/mBio.01397-16>
 14. Лазарева И.В., Старкова П.С., Агеев В.А., Волкова М.О., Лебедева М.С., Навацкая А.С. и др. Оценка распространения ректального носительства генов вирулентности и карбапенемаз у пациентов, поступивших на плановую госпитализацию. *Антибиотики и химиотерапия.* 2018; 63(11–12): 18–23.
 15. Fang C., Chuang Y., Shun C., Chang S., Wang J. A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. *J. Exp. Med.* 2004; 199(5): 697–705. <https://doi.org/10.1084/jem.20030857>
 16. Lee C.R., Lee J.H., Park K.S., Jeon J.H., Kim Y.B., Cha C.J., et al. Antimicrobial resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, hypervirulence-associated determinants, and resistance mechanisms. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2017; 7: 483. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00483>
 17. Russo T.A., Olson R., Fang C.T., Stoesser N., Miller M., Macdonald U., et al. Identification of biomarkers for differentiation of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from classical *K. pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* 2018; 56(9): e00776-18.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00776-18>
 18. Russo T.A., Olson R., Macdonald U., Metzger D., Maltese L.M., Drake E.J., et al. Aerobactin mediates virulence and accounts for increased siderophore production under iron-limiting conditions by hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* 2014; 82(6): 2356–67.
<https://doi.org/10.1128/IAI.01667-13>
 19. Compain F., Babosan A., Brisse S., Genel N., Ailloud F., et al. Multiplex PCR for detection of seven virulence factors and K1/K2 capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52(12): 4377–80.
<https://doi.org/10.1128/JCM.02316-14>
 20. Медицинская статистика. Анализ произвольных таблиц сопряженности с использованием критерия хи-квадрат (онлайн калькулятор). Available at: <https://medstatistic.ru/calculators/calchit.html>
 21. Shon A.S., Bajwa R.P., Russo T.A. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence.* 2013; 4(2): 107–18.
<https://doi.org/10.4161/viru.22718>
 22. Lee H.C., Chuang Y.C., Yu W.L., Lee N.Y., Chang C.M., Ko N.Y., et al. Clinical implications of hypermucoviscosity phenotype in *Klebsiella pneumoniae* isolates: association with invasive syndrome in patients with community-acquired bacteraemia. *J. Intern. Med.* 2006; 259(6): 606–14.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2006.01641.x>
 23. Gorrie C.L., Mirceta M., Wick R.R., Edwards D.J., Thomson N.R., Strugnell R.A., et al. Gastrointestinal carriage is a major reservoir of *Klebsiella pneumoniae* infection in intensive care patients. *Clin. Infect. Dis.* 2017; 65(2): 208–15.
<https://doi.org/10.1093/cid/cix270>
 24. Martin R.M., Cao J., Brisse S., Passet V., Wu W., Zhao L., et al. Molecular epidemiology of colonizing and infecting isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *mSphere.* 2016; 1(5): e00261.
<https://doi.org/10.1128/mSphere.00261-16>
 25. Fung C.P., Lin Y.T., Lin J.C., Chen T.L., Yeh K.M., Chang F.Y., et al. *Klebsiella pneumoniae* in gastrointestinal tract and pyogenic liver abscess. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(8): 1322–5.
<https://doi.org/10.3201/eid1808.111053>
 26. Семенова Д.Р., Николаева И.В., Фиалкина С.В., Хаертынов Х.С., Анохин В.А., Валиуллини И.Р. Частота колонизации «гипервирулентными» штаммами *Klebsiella pneumoniae* новорожденных и грудных детей с внебольничной и нозокомиальной клебсиеллезной инфекцией. *Российский вестник перинатологии и педиатрии.* 2020; 65(5): 158–63.
<https://doi.org/10.21508/1027-4065-2020-65-5-158-163>
 27. Cheng H.Y., Chen Y.S., Wu C.Y., Chang H.Y., Lai Y.C., Peng H.L. RmpA regulation of capsular polysaccharide biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *J. Bacteriol.* 2010; 192(12): 3144–58.
<https://doi.org/10.1128/JB.00031-10>
 28. Фурсова Н.К., Асташкин Е.И., Новикова Т.С., Федюкина Г.Н., Ершова О.Н. Мультирезистентные *Klebsiella pneumoniae*, вызвавшие тяжёлые формы инфекций у пациентов в отделении нейрореанимации. В кн.: Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2020». М.; 2020: 79–80.
<https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-79>
 29. Kislichkina A.A., Lev A.I., Komisarova E.V., Fursova N.K., Myakinina V.P., Mukhina T.N., et al. Genome sequencing and comparative analysis of three hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in Russia. *Pathog. Dis. Vol.* 2017; 75(4). <https://doi.org/10.1093/femspd/ftx024>
 30. Jagnow J., Clegg S. *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces. *Microbiology.* 2003; 149(Pt. 9): 2397–405.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.26434-0>
 31. Murphy C.N., Clegg S. *Klebsiella pneumoniae* and type 3 fimbriae: nosocomial infection, regulation and biofilm formation. *Future Microbiol.* 2012; 7(8): 991–1002.
<https://doi.org/10.2217/fmb.12.74>
 32. Yu W.L., Ko W.C., Cheng K.C., Lee C.C., Lai C.C., Chuang Y.C. Comparison of prevalence of virulence factors for *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 62(2): 1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.04.007>
 33. Brisse S., Fevre C., Passet V., Issenhuth-Jeanjean S., Tournebize R., Diancourt L., et al. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PLoS One.* 2009; 4(3): e4982. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004982>
 34. Chou H.C., Lee C.Z., Ma L.C., Fang C.T., Chang S.C., Wang J.T. Isolation of a chromosomal region of *Klebsiella pneumoniae* associated with allantoin metabolism and liver infection. *Infect. Immun.* 2004; 72(7): 3783–92.
<https://doi.org/10.1128/IAI.72.7.3783-3792.2004>
 35. Garaizar J., Porwollik S., Echeita A., Rementeria A., Herrera S., Wong R.M., et al. DNA microarray-based typing of an atypical monophasic *Salmonella enterica* serovar. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(6): 2074–8.
<https://doi.org/10.1128/JCM.40.6.2074-2078.2002>
 36. Rintoul M.R., Cusa E., Baldoma L., Badia J., Reitzer L., Aguilar J. Regulation of the *Escherichia coli* allantoin regulon: coordinated function of the repressor AllR and the activator AllS. *J. Mol. Biol.* 2002; 324(4): 599–610.
[https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(02\)01134-8](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(02)01134-8)

REFERENCES

1. Bagley S.T. Habitat association of *Klebsiella* species. *Infect. Control.* 1985; 6(2): 52–8. <https://doi.org/10.1017/S0195941700062603>
2. Jarvis W.R., Munn V.P., Highsmith A.K., Culver D.H., Hughes J.M. The epidemiology of nosocomial infections caused by *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Control.* 1985; 6(2): 68–74. <https://doi.org/10.1017/s0195941700062639>
3. Marchaim D., Chopra T., Pogue J.M., Perez F., Hujer A.M., Rudin S., et al. Outbreak of colistin-resistant, carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in metropolitan Detroit, Michigan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011; 55(2): 593–9. <https://doi.org/10.1128/AAC.01020-10>
4. Komisarova E.V., Volozhantsev N.V. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: a new infectious threat. 2019; 17(3): 81–9. <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2019-3-81-89>
5. Khaertynov K.S., Anokhin V.A., Davidyuk Y.N., Nicolaeva I.V., Khalioullina S.V., Semyanova D.R., et al. Case of meningitis in a neonate caused by an extended-spectrum-beta-lactamase-producing strain of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Microbiol.* 2017; 8: 1576. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01576>
6. Frazee B.W., Hansen S., Lambert L. Invasive infection with hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae*: multiple cases presenting to a single emergency department in the United States. *Ann. Emerg. Med.* 2009; 53(5): 639–42. <https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2008.11.007>
7. McCabe R., Lambert L., Frazee B. Invasive *Klebsiella pneumoniae* infections, California, USA. *Emerg. Infect. Dis.* 2010; 16(9): 1490–1. <https://doi.org/10.3201/eid1609.100386>
8. Kaur C.P., Vadivelu J., Chandramathi S. Impact of *Klebsiella pneumoniae* in lower gastrointestinal tract diseases. *J. Dig. Dis.* 2018; 19(5): 262–71. <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12595>
9. Atarashi K., Suda W., Luo C., Kawaguchi T., Motoo I., Narushima S., et al. Ectopic colonization of oral bacteria in the intestine drives TH1 cell induction and inflammation. *Science.* 2017; 358(6361): 359–65. <https://doi.org/10.1126/science.aan4526>
10. Choby J.E., Howard-Anderson J., Weiss D.S. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* — clinical and molecular perspectives (Review). *J. Intern. Med.* 2020; 287(3): 283–300. <https://doi.org/10.1111/joim.13007>
11. Jian-Li W., Yuan-Yuan S., Shou-Yu G., Fei-Fei D., Jia-Yu Y., Xue-Hua W., et al. Serotype and virulence genes of *Klebsiella pneumoniae* isolated from mink and its pathogenesis in mice and mink. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 17291. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17681-8>
12. Turton J.F., Payne Z., Coward A., Hopkins K.L., Turton J.A., Doumith M., et al. Virulence genes in isolates of *Klebsiella pneumoniae* from the UK during 2016, including among carbapenemase gene-positive hypervirulent K1-ST23 and 'non-hypervirulent' types ST147, ST15 and ST383. *J. Med. Microbiol.* 2018; 67(1): 118–28. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000653>
13. Holden V.I., Breen P., Houle S., Dozois C.M., Bachman M.A. *Klebsiella pneumoniae* siderophores induce inflammation, bacterial dissemination, and HIF-1 α stabilization during pneumonia. *mBio.* 2016; 7(5): e01397-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01397-16>
14. Lazareva I.V., Starkova P.S., Ageevets V.A., Volkova M.O., Lebedeva M.S., Navatskaya A.S., et al. Assessment of the distribution of rectal carriage of virulence and carbapenemase genes in patients enrolled for planned hospitalization. *Antibiotiki i khimioterapiya.* 2018; 63(11–12): 18–23. (in Russian)
15. Fang C., Chuang Y., Shun C., Chang S., Wang J. A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. *J. Exp. Med.* 2004; 199(5): 697–705. <https://doi.org/10.1084/jem.20030857>
16. Lee C.R., Lee J.H., Park K.S., Jeon J.H., Kim Y.B., Cha C.J., et al. Antimicrobial resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, hypervirulence-associated determinants, and resistance mechanisms. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2017; 7: 483. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00483>
17. Russo T.A., Olson R., Fang C.T., Stoesser N., Miller M., Macdonald U., et al. Identification of biomarkers for differentiation of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from classical *K. pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* 2018; 56(9): e00776-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.00776-18>
18. Russo T.A., Olson R., Macdonald U., Metzger D., Maltese L.M., Drake E.J., et al. Aerobactin mediates virulence and accounts for increased siderophore production under iron-limiting conditions by hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* 2014; 82(6): 2356–67. <https://doi.org/10.1128/IAI.01667-13>
19. Compain F., Babosan A., Brisse S., Genel N., Audouard J., Ailoud F., et al. Multiplex PCR for detection of seven virulence factors and K1/K2 capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52(12): 4377–80. <https://doi.org/10.1128/JCM.02316-14>
20. Medstatistic. Analysis of arbitrary conjugacy tables using the chi-square criterion (online calculator). Available at: <https://medstatistic.ru/calculators/calchit.html> (in Russian)
21. Shon A.S., Bajwa R.P., Russo T.A. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence.* 2013; 4(2): 107–18. <https://doi.org/10.4161/viru.22718>
22. Lee H.C., Chuang Y.C., Yu W.L., Lee N.Y., Chang C.M., Ko N.Y., et al. Clinical implications of hypermucoviscosity phenotype in *Klebsiella pneumoniae* isolates: association with invasive syndrome in patients with community-acquired bacteraemia. *J. Intern. Med.* 2006; 259(6): 606–14. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2006.01641.x>
23. Gorrie C.L., Mirceta M., Wick R.R., Edwards D.J., Thomson N.R., Strugnell R.A., et al. Gastrointestinal carriage is a major reservoir of *Klebsiella pneumoniae* infection in intensive care patients. *Clin. Infect. Dis.* 2017; 65(2): 208–15. <https://doi.org/10.1093/cid/cix270>
24. Martin R.M., Cao J., Brisse S., Passet V., Wu W., Zhao L., et al. Molecular epidemiology of colonizing and infecting isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *mSphere.* 2016; 1(5): e00261. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00261-16>
25. Fung C.P., Lin Y.T., Lin J.C., Chen T.L., Yeh K.M., Chang F.Y., et al. *Klebsiella pneumoniae* in gastrointestinal tract and pyogenic liver abscess. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(8): 1322–5. <https://doi.org/10.3201/eid1808.111053>
26. Semenova D.R., Nikolaeva I.V., Fialkina S.V., Khaertynov Kh.S., Anokhin V.A., Valiullina I.R. Frequency of colonization with "hypervirulent" *Klebsiella pneumoniae* strains of newborns and infants with community-acquired and nosocomial *Klebsiella* infection. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii.* 2020; 65(5): 158–63. <https://doi.org/10.21508/1027-4065-2020-65-5-158-163> (in Russian)
27. Cheng H.Y., Chen Y.S., Wu C.Y., Chang H.Y., Lai Y.C., Peng H.L. RmpA regulation of capsular polysaccharide biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *J. Bacteriol.* 2010; 192(12): 3144–58. <https://doi.org/10.1128/JB.00031-10>
28. Fursova N.K., Astashkin E.I., Novikova T.S., Fedjukina G.N., Ershova O.N. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* caused severe infections in the Neuro-ICU. In: Proceedings of Russian National Scientific and Practical Conference with International Participation «Molecular Diagnostics and Biosafety – 2020» [Sbornik materialov Vserossiyskaya nauchno-prakticheskaya konferentsiya s mezhdunarodnym uchastiem «Molekulyarnaya diagnostika i biobezopasnost' – 2020»]. Moscow; 2020: 79–80. <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-79>
29. Kislichkina A.A., Lev A.I., Komisarova E.V., Fursova N.K., Myakinina V.P., Mukhina T.N., et al. Genome sequencing and comparative analysis of three hypermucoviscous *Klebsiella*

- pneumoniae* strains isolated in Russia. *Pathog. Dis. Vol.* 2017; 75(4). <https://doi.org/10.1093/femspd/ftx024>
30. Jagnow J., Clegg S. *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces. *Microbiology.* 2003; 149(Pt. 9): 2397–405. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26434-0>
 31. Murphy C.N., Clegg S. *Klebsiella pneumoniae* and type 3 fimbriae: nosocomial infection, regulation and biofilm formation. *Future Microbiol.* 2012; 7(8): 991–1002. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.74>
 32. Yu W.L., Ko W.C., Cheng K.C., Lee C.C., Lai C.C., Chuang Y.C. Comparison of prevalence of virulence factors for *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 62(2): 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.04.007>
 33. Brisse S., Fevre C., Passet V., Issenhuth-Jeanjean S., Tournebise R., Diancourt L., et al. Virulent clones of *Klebsiella pneumo-*
 - niae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PLoS One.* 2009; 4(3): e4982. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004982>
 34. Chou H.C., Lee C.Z., Ma L.C., Fang C.T., Chang S.C., Wang J.T. Isolation of a chromosomal region of *Klebsiella pneumoniae* associated with allantoin metabolism and liver infection. *Infect. Immun.* 2004; 72(7): 3783–92. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.7.3783-3792.2004>
 35. Garaizar J., Porwollik S., Echeita A., Rementeria A., Herrera S., Wong R.M., et al. DNA microarray-based typing of an atypical monophasic *Salmonella enterica* serovar. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(6): 2074–8. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.6.2074-2078.2002>
 36. Rintoul M.R., Cusa E., Baldoma L., Badia J., Reitzer L., Aguilar J. Regulation of the *Escherichia coli* allantoin regulon: coordinated function of the repressor AllR and the activator AllS. *J. Mol. Biol.* 2002; 324(4): 599–610. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(02\)01134-8](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(02)01134-8)

Информация об авторах

Пай Галина Васильевна — к.м.н., с.н.с. лаб. микробиологии и паразитологии ЦСП ФМБА, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7086-0899>

Ракитина Дарья Викторовна — к.б.н., с.н.с. лаб. микробиологии и паразитологии ЦСП ФМБА, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3554-7690>

Сухина Марина Алексеевна — к.б.н., с.н.с. лаб. микробиологии и паразитологии ЦСП ФМБА, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4795-0751>

Юдин Сергей Михайлович — д.м.н., профессор, генеральный директор ЦСП ФМБА, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7942-8004>

Макаров Валентин Владимирович — к.б.н., начальник отдела анализа и прогнозирования медико-биологическими рисками ЦСП ФМБА, Москва, Россия, SCOPUS ID: 56273845200

Мания Тамари Резоевна[✉] — н.с. лаб. микробиологии и паразитологии ЦСП ФМБА, Москва, Россия, tmaniya@cspmpz.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6295-661X>

Загайнова Анжелика Владимировна — к.б.н., зав. лаб. микробиологии и паразитологии ЦСП ФМБА, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4772-9686>

Участие авторов. Концепция и дизайн исследования — Пай Г.В., Загайнова А.В.; сбор материала — Пай Г.В., Сухина М.А., Мания Т.Р.; постановка эксперимента — Пай Г.В., Ракитина Д.В.; написание текста — Пай Г.В., Ракитина Д.В.; статистическая обработка данных — Пай Г.В.; редактирование — Юдин С.М., Макаров В.В. Все соавторы — утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Статья поступила в редакцию 08.02.2022;
принята к публикации 03.05.2022;
опубликована 30.08.2022

Information about the authors

Galina V. Pay — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of microbiology and parasitology, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risk of the FMBA, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7086-0899>

Daria V. Rakitina — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of microbiology and parasitology, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risk of the FMBA, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3554-7690>

Marina A. Sukhina — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of microbiology and parasitology, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risk of the FMBA, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4795-0751>

Sergey M. Yudin — D. Sci. (Med.), Professor, Director, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risk of the FMBA, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7942-8004>

Valentin V. Makarov — Cand. Sci. (Biol.), Head, Department for analysis and forecasting medical and biological risks, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risk of the FMBA, Moscow, Russia, SCOPUS ID: 56273845200

Tamari R. Maniya[✉] — researcher, Laboratory of microbiology and parasitology, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risk of the FMBA, Moscow, Russia, tmaniya@cspmpz.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6295-661X>

Angelika V. Zagaynova — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of microbiology and parasitology, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risk of the FMBA, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4772-9686>

Author contribution. Research concept and design — Pay G.V., Zagaynova A.V.; collection of material — Pay G.V., Sukhina M.A., Maniya T.R.; performing the experiment — Pay G.V., Rakitina D.V.; writing the text — Pay G.V., Rakitina D.V.; statistical data processing — Pay G.V.; editing — Yudin S.M., Makarov V.V. All authors are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of the manuscript final version.

The article was submitted 08.02.2022;
accepted for publication 03.05.2022;
published 30.08.2022



Изучение микробных факторов при обострении полипозного риносинусита

Савлевич Е.Л.^{1,2✉}, Егоров В.И.², Савушкина Е.Ю.², Зурочка А.В.^{3,4}, Герасимов А.Н.⁵, Митрофанова Е.С.⁶, Любимова Е.В.⁷

¹Центральная государственная медицинская академия, Москва, Россия;

²Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского, Москва, Россия;

³Институт иммунологии и физиологии, Екатеринбург, Россия;

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

⁵Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

⁶Академия постдипломного образования Федерального научного клинического центра, Москва, Россия;

⁷ООО «ЛОР клиника», Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Полипозный риносинусит (ПРС) считается мультифакторным заболеванием. Имеются данные по участию в инициации и развитии воспалительного процесса грибов и вирусов, о влиянии суперантигенов, биоплёнок и микробиоты на рост полипов в околоносовых пазухах. Обострение заболевания у больных ПРС приводит к значительному снижению качества жизни.

Цель исследования — исследовать бактериальную составляющую микробиоты слизистой оболочки носа и околоносовых пазух у больных с ПРС в период ремиссии и во время обострения.

Материалы и методы. Обследовано 83 человека с ПРС: 44 пациента в период ремиссии, 39 человек в период обострения. У всех пациентов проводилась качественная и количественная оценка бактериальной составляющей микробиоты полости носа.

Результаты. Достоверной разницы в количественном и качественном составе микробиоты полости носа в период обострения и ремиссии воспалительного процесса, а также до и после лечения обострения ПРС нет. Количественная оценка идентифицированных микроорганизмов находилась в подавляющем большинстве случаев в пределах нормы в период обострения и ремиссии воспалительного процесса.

Ключевые слова: полипозный риносинусит, обострение хронического риносинусита, *Staphylococcus aureus*, микробиота

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ЦГМА (протокол № 2 от 27.02.2018).

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

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

Для цитирования: Савлевич Е.Л., Егоров В.И., Савушкина Е.Ю., Зурочка А.В., Герасимов А.Н., Митрофанова Е.С., Любимова Е.В. Изучение микробных факторов при обострении полипозного риносинусита. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(4):445–452.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-201>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-201>

Study of microbial factors in exacerbation of chronic rhinosinusitis with nasal polyps

Elena L. Savlevich^{1, 2✉}, Victor I. Egorov², Elizaveta Yu. Savushkina², Alexander V. Zurochka^{3, 4}, Andrey N. Gerasimov⁵, Elizaveta S. Mitrofanova⁶, Elena V. Lyubimova⁷

¹Central State Medical Academy, Moscow, Russia;

²M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russia;

³Institute of Immunology and Physiology, Ekaterinburg, Russia;

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

⁵I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia;

⁶Federal Research and Clinical Center, Moscow, Russia;

⁷LLC «LOR clinic», Yekaterinburg, Russia

Abstract

Introduction. Chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) is considered a multifactorial disease. There are data on the contribution of fungi and viruses to the initiation and development of the inflammatory process, data on the effect of superantigens, biofilms and microbiota on the growth of polyps in the paranasal sinuses. Exacerbation of the disease in patients with CRSwNP leads to a significant decrease in the quality of life.

Aim. To study the bacterial component of the microbiota of nasal and paranasal mucosa in patients with CRSwNP during remission and exacerbation.

Materials and methods. 83 patients with CRSwNP were examined (44 patients in remission, 39 people in the period of exacerbation of the disease). A qualitative and quantitative analysis of bacterial component of the microbiota in all patients were carried out.

Results. No significant differences in the qualitative and quantitative composition of the nasal cavity microbiota during exacerbation and remission of inflammatory process were observed, as well as before and after treatment of the CRSwNP exacerbation. The quantitative assessment of the identified microorganisms in the vast majority of cases was within the normal range.

Keywords: chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP), exacerbation of chronic rhinosinusitis, *Staphylococcus aureus*, microbiota

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Central State Medical Academy (protocol No. 2, February 27, 2018).

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

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

For citation: Savlevich E.L., Egorov V.I., Savushkina E.Yu., Zurochka A.V., Gerasimov A.N., Mitrofanova E.S., Lyubimova E.V. Study of microbial factors in exacerbation of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, épidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(4):445–452.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-201>

Введение

Полипозный риносинусит (ПРС) является одной из самых актуальных проблем в оториноларингологии. По данным различных эпидемиологических исследований, в России ПРС наблюдается примерно у 1 млн 400 тыс. человек, что составляет 1% населения страны, а в мире этим заболеванием страдают от 2 до 4% жителей [1]. ПРС представляет собой хроническое заболевание слизистой оболочки носа и околоносовых пазух (ОНП), основой патологического процесса которого является аномальный иммунный ответ с преобладанием эозинофилов или нейтрофилов. На сегодняшний день не существует единой теории этиопатогенеза ПРС, поэтому данное заболевание считается мультифакторным, когда при

наличии различных дефектов местного иммунитета определённые триггеры способны вызвать развитие продуктивного воспалительного процесса [2].

Существуют 5 гипотез инфекционного этиопатогенеза ПРС.

Согласно первой гипотезе, грибы рода *Alternaria* и *Aspergillus* активируют хемотаксис эозинофилов в слизистую оболочку носа и ОНП с последующим развитием классической воспалительной реакции, которая может усиливаться под действием собственных протеаз грибков, с участием Т-хелперов (Th) 2-го типа с формированием полипозной ткани [3, 4]. С другой стороны, на слизистой оболочке верхних дыхательных путей грибы выявляют в 50–87% случаев у здоровых людей и паци-

ентов с ПРС [5] и нет доказательств эффективности местного применения амфотерицина В при лечении ПРС [1, 6].

Вторая гипотеза — формирование ПРС под воздействием респираторных вирусов, которые повреждают клетки мерцательного эпителия, нарушая его барьерную функцию [2, 7]. Самым распространённым при ПРС является риновирус, он выявлен в 26,1–64,0% образцах назальной слизи, в 31,4% образцах слизистой оболочки и в 50% образцах смывов из полости носа [7, 8]; риносинцитиальный вирус обнаружен в эпителиальных клетках у 20–21% пациентов с ПРС [9]. При ПРС также повышено содержание вируса Эпштейна–Барр в полипозной ткани [10, 11].

Третья гипотеза — теория стафилококкового суперантигена, которая основана на том, что около 80% штаммов *Staphylococcus aureus* способны продуцировать энтеротоксин, который может выступать в роли суперантигена [12], прикрепляться в нетипичном месте к главному комплексу гистосовместимости 2-го типа, на антигенпрезентирующей клетке, обходя нормальные этапы распознавания антигена, способствуя поликлональной активации большего количества наивных Т-лимфоцитов по сравнению со стандартным антигенспецифическим иммунным ответом, превращая их в Th2 [13]. Однако, по данным других исследователей, признаки влияния энтеротоксина на воспалительный процесс выявляют только у половины исследованных пациентов с ПРС [14].

Четвёртая гипотеза — влияние биоплёнок на формирование ПРС. Биоплёнки обнаруживали у 70% больных с ПРС, при этом *S. aureus* выявлен в 49% случаев, а *Haemophilus influenzae* — в 35%, чаще в ассоциации с *S. aureus* [15]. После полисинусотомии биоплёнки, преимущественно содержащие *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli*, были обнаружены у 71% больных с ранними рецидивами, более тяжёлыми клиническими проявлениями и частыми обострениями ПРС [16]. Собрано много фактов, косвенно подтверждающих негативное воздействие биоплёнок на клиническое течение заболевания при ПРС, однако механизм их влияния на образование полипов требует дальнейшего изучения.

В основе пятой гипотезы лежит предположение о том, что нарушение качественного и количественного состава микробной колонизации с преобладанием грамположительных бактерий на фоне угнетения местного иммунитета слизистой оболочки полости носа и ОНП [2] является пусковым механизмом развития ПРС [17, 18]. Хотя, скорее, можно предположить, что дисбиоз слизистой оболочки является одним из предрасполагающих или дополнительных факторов развития ПРС.

Таким образом, ПРС является многофактор-

ным заболеванием. При ПРС используются понятия «обострение» и «рецидив патологического процесса». Признаком рецидива ПРС является активный рост полипов, а обострение ПРС подразумевает клинические проявления непосредственно хронического воспалительного процесса в ОНП. Пациенты предъявляют жалобы на усиление заложенности носа, появление обильных гнойных или слизисто-гнойных выделений, которые, вследствие механического препятствия из-за наличия полипов в полости носа, в основном стекают по задней стенке глотки, вызывая в ней дискомфортные явления и мучительный малопродуктивный кашель [19]. Существует мнение, что, возможно, обострение ПРС обусловлено присоединением вторичной инфекции или связано с активацией уже имеющейся условно-патогенной флоры на фоне сниженного иммунного ответа. С другой стороны, обострение ПРС с трудом поддаётся лечению системными антибактериальными препаратами.

Цель работы — исследовать бактериальную составляющую микробиоты слизистой оболочки носа и ОНП у больных ПРС в период ремиссии и во время обострения.

Материалы и методы

В клиничко-диагностическом отделении МОНКИ им. М.Ф. Владимирского с мая 2018 г. по март 2019 г. было обследовано 83 человека с ПРС: 36 мужчин (средний возраст $45,2 \pm 3,8$ года) и 47 женщин (средний возраст $42,1 \pm 4,4$ года). Из них 44 пациента находились в состоянии ремиссии и поступили для выполнения планового хирургического лечения, 39 человек были в состоянии обострения ПРС.

Диагноз ПРС устанавливали на основе клинической картины, данных эндоскопического осмотра и лучевой диагностики в объёме компьютерной томографии ОНП, обострение ПРС определяли на основании субъективных жалоб и данных эндоскопического осмотра (гиперемия, отёк слизистой оболочки полости носа и наличие слизисто-гнойных выделений в среднем и общем носовых ходах). Забор отделяемого из полости носа для исследования был выполнен всем пациентам при первичном осмотре по стандартной методике: стерильный тампон-зонд вводили через полость носа к средней носовой раковине, не задевая соседние анатомические структуры, затем, после экспозиции 20 с, помещали в стерильную пробирку. Забранный материал доставляли в лабораторию в течение 2 ч с соблюдением всех требований для транспортировки.

Посев биологического материала производили на плотные питательные среды:

- сердечно-мозговой агар (ВН1) с 5% бараньей крови — для выделения бактерий родов

Streptococcus, *Corynebacterium*, *Arcanobacterium*, *Neisseria*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Actinomyces*;

- желточно-солевой агар с маннитом — для выделения и дифференциации стафилококков;
- дифференциально-диагностические среды Эндо или Левина — для выделения *Enterobacteriaceae*;
- среду Сабуро с хлорамфениколом — для выделения дрожжевых и мицелиальных грибов;
- ВНИ с 5% бараньей крови и агар Шадлера — для выделения облигатно-анаэробных бактерий *Clostridium*, *Propionibacterium*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*.

Засеянные плотные питательные среды инкубировали в термостате при 37°C в течение 24–48 ч. Для создания анаэробных условий использовали анаэробную станцию «Whitley A35», где засеянные питательные среды инкубировали при 37°C от 48 ч до 10 сут. Посевы просматривали, отмечали морфологию выросших колоний, наличие гемолиза, форму роста микроорганизмов (в виде монокультуры или в ассоциации). При обнаружении ассоциации на плотной питательной среде отмечали преимущественный рост какого-либо представителя ассоциации. Производили отсевы отдельных колоний с целью получения чистых культур. Полученные выделенные чистые культуры микроорганизмов микроскопировали, отмечали их морфологические и тинкториальные особенности, производили экстракцию этанолом/муравьиной кислотой для последующей идентификации до вида методом масс-спектрометрии на времяпролётном масс-спектрометре (MALDI-TOF).

Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ЦГМА (протокол № 2 от 27.02.2018). Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы «IBM SPSS Statistics v.23.0». Описательную статистику для переменных представляли в виде среднего значения и его стандартного отклонения. Все измеряемые величины по шкалам являются качественными порядковыми, поэтому для анализа полученных данных применяли критерии для непараметрических распределений. Сравнение по шкале ВАШ в группах пациентов до и после лечения проводили с использованием критерия Вилкоксона для связанных выборок. Для оценки различий между двумя группами пациентов по изменению балла ВАШ и эндоскопического осмотра использовали U-тест Манна–Уитни. Для оценки статистической значимости полученных результатов принимали уровень значимости $p = 0,05$. Количественные и порядковые

данные представлены в виде $M \pm SD$ (m ; Q_1 ; Q_3), где M — среднее арифметическое, SD — стандартное отклонение; в виде m [Q_1 ; Q_3], где m — медиана распределения, Q_1 — значение 25% квартиля, Q_3 — значение 75% квартиля.

Результаты

При эндоскопическом осмотре всех больных ПРС в средних и общих носовых ходах определялась полипозная ткань, степень распространённости которой оценивали по международной классификации от 0 до 3 баллов [8], при этом баллы в разных половинах носа суммировали. У всех больных определен суммарный балл от 3 до 5.

У пациентов вне обострения ПРС при бактериологическом исследовании отделяемого со слизистой оболочки полости носа выявлено:

- *S. aureus* — у 24 (54,5%) человек с колонизацией $10^{3,1} \pm 10^{1,9}$ КОЕ;
- бактерии семейства *Enterobacteriaceae* — у 14 (31,8%) человек с колонизацией $10^{2,3} \pm 10^{1,9}$ КОЕ;
- *Streptococcus pneumoniae* — у 8 (18,2%) человек с колонизацией $10^{1,9} \pm 10^{1,4}$ КОЕ;
- негемолитические бактерии рода *Streptococcus* — у 4 (9,1%) человек с колонизацией $10^{2,5} \pm 10^{1,7}$ КОЕ;
- представители нормальной микрофлоры полости носа (*Veillonella parvula*, *Corynebacterium tuberculostearicum*, *Pseudomonas stutzeri*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Streptococcus parasanguis*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus warneri*) — у 6 (13,6%) человек с колонизацией $10^{1,2} \pm 10^{0,4}$ КОЕ;
- *Staphylococcus epidermidis* — у 30 (68,2%) человек с колонизацией $10^{1,3} \pm 10^{0,4}$ КОЕ;
- бактерии рода *Corynebacterium* — у 10 (22,7%) человек с колонизацией $10^{1,6} \pm 10^{1,3}$ КОЕ;
- сапрофиты-комменсалы (*Acinetobacter lwoffii*, *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter pittii*, *Propionibacterium avidum*, *Propionibacterium granulosum*, *Acinetobacter junii*, *Bacillus* spp., *Bacillus pumilus*) — у 18 (40,9%) человек с колонизацией $10^{1,3} \pm 10^{1,0}$ КОЕ;
- условно-патогенные бактерии рода *Staphylococcus* — у 7 (15,9%) человек с колонизацией $10^{1,3} \pm 10^{0,5}$ КОЕ;
- *Propionibacterium acnes* — у 19 (43,2%) человек с колонизацией $10^{1,4} \pm 10^{0,5}$ КОЕ;
- *Moraxella catarrhalis* — у 6 (13,6%) человек с колонизацией $10^{3,8} \pm 10^{1,8}$ КОЕ;
- *Streptococcus pyogenes* — у 4 (9,1%) человек с колонизацией $10^{3,7} \pm 10^{0,5}$ КОЕ;
- представитель семейства *Enterobacteriaceae* *Klebsiella pneumoniae* — у 5 (11,4%) человек с колонизацией $10^{3,8} \pm 10^{0,4}$ КОЕ;

- *Pseudomonas aeruginosa* — у 5 (11,4%) человек с колонизацией $10^{3,2} \pm 10^{1,1}$ КОЕ.

Слизистая оболочка полости носа, являясь входными воротами организма, непрерывно сталкивается с огромным количеством поллютантов, микроорганизмов, поэтому в норме на ней также присутствует достаточное количество транзитных и постоянных видов бактерий. У всех пациентов выявлены бактерии с колонизацией 10^5 КОЕ и ниже, что является количественной нормой [20, 21].

При обращении пациентов с обострением ПРС выявлялись следующие жалобы:

- усиление заложенности носа или затруднения носового дыхания — $7,3 \pm 1,8$ или 8 [6; 9] балла;
- появление гнойных или слизисто-гнойных выделений из носа (передняя ринорея) — $7,6 \pm 1,2$ или 8 [7; 9] балла;
- стекание их по задней стенке глотки (задняя ринорея) — $8,4 \pm 1,4$ или 9 [8; 9] балла;
- усиление малопродуктивного кашля — $6,5 \pm 1,8$ или 6 [5; 8] балла.

При эндоскопическом осмотре полости носа отёчность слизистой оболочки оценивалась в $8,7 \pm 0,8$ или $8,8$ [8,5; 9,2] баллов, наличие гнойного или слизисто-гнойного отделяемого в полости носа — в $8,5 \pm 1,2$ или $8,5$ [7,9; 8,7] балла.

При бактериологическом исследовании отделяемого со слизистой оболочки полости носа у пациентов при обострении ПРС выявлено:

- *S. aureus* — у 21 (54,5%) человека с колонизацией $10^{3,1} \pm 10^{1,9}$ КОЕ;
- бактерии семейства *Enterobacteriaceae* — у 12 (31,8%) человек с колонизацией $10^{2,3} \pm 10^{1,3}$ КОЕ;
- *Streptococcus pneumoniae* — у 7 (18,2%) человек с колонизацией $10^{4,1} \pm 10^{2,0}$ КОЕ;
- негемолитические бактерии рода *Streptococcus* у 7 (9,1%) человек с колонизацией $10^{4,3} \pm 10^{0,5}$ КОЕ;
- представители непатогенной флоры (*Veillonella parvula*, *Corynebacterium tuberculostearicum*, *Pseudomonas stutzeri*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Streptococcus parangsuis*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus warneri*) — у 5 (13,6%) человек с колонизацией $10^{1,9} \pm 10^{0,4}$ КОЕ;
- *Staphylococcus epidermidis* — у 27 (68,2%) человек с колонизацией $10^{1,2} \pm 10^{0,4}$ КОЕ;
- бактерии рода *Corynebacterium* — у 9 (22,7%) человек с колонизацией $10^{3,1} \pm 10^{2,2}$ КОЕ;
- комменсалы (*Acinetobacter lwoffii*, *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter pittii*, *Propionibacterium avidum*, *Propionibacterium granulosum*, *Acinetobacter junii*, *Bacillus* spp., *Bacillus pumilus*) — у 16 (40,9%) человек с колонизацией $10^{1,6} \pm 10^{1,2}$ КОЕ;

- условно-патогенные бактерии рода *Staphylococcus* — у 6 (15,9%) человек с колонизацией $10^{1,2} \pm 10^{0,4}$ КОЕ;
- *Propionibacterium acnes* — у 17 (43,2%) человек с колонизацией $10^{2,1} \pm 10^{1,2}$ КОЕ.

Был замечен интересный факт. Несмотря на то что практически все выделенные из полости носа микроорганизмы во всех группах были в пределах количественной нормы (не более 10^5 КОЕ), лишь 12 человек с обострением ПРС имели повышение титров *S. aureus* до 10^6 – 10^7 КОЕ. Достоверной разницы в количественном и качественном составе микробиоты полости носа в период обострения и ремиссии воспалительного процесса при ПРС не выявлено.

Обсуждение

ПРС является сложным патологическим состоянием, при котором врачу следует контролировать 2 одновременно протекающих процесса: предотвращать рецидив роста полипов и уменьшать выраженность симптомов обострения хронического риносинусита как такового в виде заложенности носа, обильных выделений из носа, боли и тяжести в проекции лицевого черепа. При анализе 500 амбулаторных карт пациентов с ПРС в Москве выявлено, что антибактериальные препараты выписывались в 28,2% случаев, из них в 73% — антибиотики группы макролидов [22]. Вместе с тем в обзоре Cochrane по применению антибиотиков при хроническом риносинусите не найдено доказательств их клинической эффективности [23], хотя системные антибиотики рекомендуются в США в 26% случаев при амбулаторном лечении пациентов с ПРС [24].

Поскольку инфекционная теория возникновения ПРС не получила подтверждения, и не было выявлено ни одного патогенного агента, являющегося прямым возбудителем ПРС, принято считать, что микроорганизмы, возможно, оказывают определённое отрицательное влияние на течение воспалительного процесса только при отдельных эндотипах ПРС. Например, повышенный титр *Corynebacteriaceae* вызывает повышенную экспрессию генов интерлейкина-5 и интерферона- γ [25].

Обострение воспалительного процесса при ПРС также является предметом тщательного изучения. Поэтому выявление в отделяемом из полости носа колонизации микроорганизмов в концентрации не более 10^5 КОЕ (в пределах количественной нормы) у всех пациентов — как при обострении, так и вне его — при отсутствии качественной и количественной разницы состава бактериальной флоры при обострении и вне его позволяет предположить, что инфекционный фактор не является определяющим при возникновении обострения хронического воспаления при ПРС. Таким образом, полученные нами данные могут объяснить

малоэффективность назначения при обострении ПРС системных антибактериальных препаратов, к которому часто прибегают оториноларингологи в клинической практике [22]. Ранее в проведенных нами исследованиях снижение системного клеточного иммунитета при ПРС не выявлено. Напротив, было найдено повышение числа Т-регуляторных ($CD4^+CD25b^{\text{right}}CD127^{\text{low to neg}}$) лимфоцитов, натуральных киллеров ($CD3^-CD16^+CD56^+$), активированных натуральных киллеров ($CD8^+CD3^-$) и В-клеток памяти ($CD19^+CD5^-CD27^+$) [26]. Это приводит к мысли, что, скорее всего, дефекты местного иммунитета слизистой оболочки полости носа не обеспечивают достаточного противодействия внешним триггерам и клинически проявляются обострением хронического воспалительного процесса [2]. Высокая обсеменённость *S. aureus* при ПРС вне обострения, а также при аллергическом рините была отмечена ранее зарубежными и российскими исследователями [14, 21, 27].

Выводы

1. Достоверной разницы в количественном и качественном составе микробиоты полости носа в период обострения и ремиссии воспалительного процесса при ПРС не выявлено. В основном обнаружены представители нормальной флоры, а среди условно-патогенной лидирует *S. aureus*, при этом его количество, как правило, также близко к норме, но имеется ряд пациентов с очень высоким (выше 10^5 КОЕ/мл) уровнем его обсеменения полости носа.

2. Количественная оценка идентифицированных микроорганизмов находилась в подавляющем большинстве случаев в пределах нормы в период обострения и ремиссии воспалительного процесса.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Козлов В.С., Савлевич Е.Л. Полипозный риносинусит. Современные подходы к изучению патогенеза, диагностике и лечению. *Вестник оториноларингологии*. 2015; 80(4): 95–9. <https://doi.org/10.17116/otorino201580495-99>
2. Егоров В.И., Савлевич Е.Л. Место врожденного иммунитета в развитии хронического риносинусита и перспективы тактики консервативного лечения. *Альманах клинической медицины*. 2016; 44(7): 850–6. <https://doi.org/10.18786/2072-0505-2016-44-7-850-856>
3. Matsuwaki Y., Wada K., White T., Moriyama H., Kita H. *Alternaria* fungus induces the production of GM-CSF, interleukin-6 and interleukin-8 and calcium signaling in human airway epithelium through protease-activated receptor 2. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2012; 158(1): 19–29. <https://doi.org/10.1159/000337756>
4. Sabirov A., Hamilton R.G., Jacobs J.B., Hillman D.E., Lebowitz R.A., Watts J.D. Role of local immunoglobulin E specific for *Alternaria alternata* in the pathogenesis of nasal polyposis. *Laryngoscope*. 2008; 118(1): 4–9. <https://doi.org/10.1097/MLG.0b013e3181567a7a>
5. Aydil U., Kalkanci A., Ceylan A., Berk E., Kuştimur S., Uslu S. Investigation of fungi in massive nasal polyps: microscopy, culture, polymerase-chain reaction, and serology. *Am. J. Rhinol.* 2007; 21(4): 417–22. <https://doi.org/10.2500/ajr.2007.21.3054>
6. Ebbens F.A., Scadding G.K., Badia L., Hellings P.W., Jorissen M., Mullol J., et al. Amphotericin B nasal lavages: not a solution for patients with chronic rhinosinusitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006; 118(5): 1149–56. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.07.058>
7. Cho G.S., Moon B.J., Lee B.J., Gong C.H., Kim N.H., Kim Y.S., et al. High rates of detection of respiratory viruses in the nasal washes and mucosae of patients with chronic rhinosinusitis. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 51(3): 979–84. <https://doi.org/10.1128/JCM.02806-12>
8. Fokkens W.J., Lund V.J., Mullol J., Bachert C., Alobid I., Barody F., et al. EPOS 2012: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. A summary for otorhinolaryngologists. *Rhinology*. 2012; 50(1): 1–12. <https://doi.org/10.4193/Rhino12.000>
9. Abshirini H., Makvandi M., Seyyed Ashrafi M., Hamidifard M., Saki N. Prevalence of rhinovirus and respiratory syncytial virus among patients with chronic rhinosinusitis. *Jundishapur J. Microbiol.* 2015; 8(3): e20068. <https://doi.org/10.5812/jjm.20068>
10. Zaravinos A., Bizakis J., Spandidos D.A. Prevalence of human papilloma virus and human herpes virus types 1-7 in human nasal polyposis. *J. Med. Virol.* 2009; 81(9): 1613–9. <https://doi.org/10.1002/jmv.21534>
11. Pei F., Chen X.P., Zhang Y., Wang Y., Chen Q., Tan X.J., et al. Human papillomavirus infection in nasal polyps in a Chinese population. *J. Gen. Virol.* 2011; 92(Pt. 8): 1795–9. <https://doi.org/10.1099/vir.0.031955-0>
12. Vickery T.W., Ramakrishnan V.R., Suh J.D. The role of *Staphylococcus aureus* in patients with chronic sinusitis and nasal polyposis. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2019; 19(4): 21. <https://doi.org/10.1007/s11882-019-0853-7>
13. Conley D.B., Tripathi A., Seiberling K.A., Schleimer R.P., Suh L.A., Harris K., et al. Superantigens and chronic rhinosinusitis: skewing of T-cell receptor V beta-distributions in polyp-derived CD4+ and CD8+ T cells. *Am. J. Rhinol.* 2006; 20(5): 534–9. <https://doi.org/10.2500/ajr.2006.20.2941>
14. Chegini Z., Didehdar M., Khoshbayan A., Karami J. The role of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *Cell Commun. Signal.* 2022; 20(1): 29. <https://doi.org/10.1186/s12964-022-00839-x>
15. Foreman A., Holtappels G., Psaltis A.J., Jervis-Bardy J., Field J., Wormald P.J., et al. Adaptive immune responses in *Staphylococcus aureus* biofilm-associated chronic rhinosinusitis. *Allergy*. 2011; 66(11): 1449–56. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2011.02678.x>
16. Singhal D., Psaltis A.J., Foreman A., Wormald P.J. The impact of biofilms on outcomes after endoscopic sinus surgery. *Am. J. Rhinol. Allergy*. 2010; 24(3): 169–74. <https://doi.org/10.2500/ajra.2010.24.3462>
17. Бондарева Г.П., Терехова А.О. Роль инфекции в формировании полипозного риносинусита у больных бронхиальной астмой. *Вестник оториноларингологии*. 2010; (3): 9–11.
18. Haddadin R.N., Saleh S.A., Ayuash M.A., Collier P.J. Occupational exposure of pharmaceutical workers to drug actives and excipients and their effect on *Staphylococcus* spp. nasal carriage and antibiotic resistance. *Int. J. Occup. Environ. Health*. 2013; 19(3): 207–14. <https://doi.org/10.1179/2049396713Y.0000000035>
19. Савлевич Е.Л., Черенкова В.А., Молодницкая А.Ю. Принципы базисной терапии полипозного риносинусита. *Медицинский совет*. 2020; (16): 73–8. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2020-16-73-78>
20. Лопатин А.С., Азизов И.С., Козлов Р.С. Микробиом полости носа и околоносовых пазух в норме и при патологии. Часть I. *Российская ринология*. 2021; 29(1): 23–30. <https://doi.org/10.17116/rosrino20212901123>

21. Коленчукова О.А., Смирнова С.В., Лаптева А.М. Количественный и качественный состав микрофлоры слизистой оболочки носа при полипозном риносинусите. *Инфекция и иммунитет*. 2016; 6(4): 366–72. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2016-4-366-372>
 22. Савлевич Е.Л., Егоров В.И., Шачнев К.Н., Татаренко Н.Г. Анализ схем лечения полипозного риносинусита в Российской Федерации. *Российская оториноларингология*. 2019; 18(1): 124–34. <https://doi.org/10.18692/1810-4800-2019-1-124-134>
 23. Head K., Chong L.Y., Piroomchai P., Hopkins C., Philpott C., Schilder A.G., et al. Systemic and topical antibiotics for chronic rhinosinusitis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2016; 4(4): CD011994. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011994>
 24. Bhattacharyya N., Kepnes L.J. Medications prescribed at ambulatory visits for nasal polyposis. *Am. J. Rhinol. Allergy*. 2013; 27(6): 479–81. <https://doi.org/10.2500/ajra.2013.27.3969>
 25. Cope E.K., Goldberg A.N., Pletcher S.D., Lynch S.V. Compositionally and functionally distinct sinus microbiota in chronic rhinosinusitis patients have immunological and clinically divergent consequences. *Microbiome*. 2017; 5(1): 53. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0266-6>
 26. Савлевич Е.Л., Хайдуков С.В., Курбачева О.М., Бондарева Г.П., Шачнев К.Н., Симбирцев А.С. Показатели клеточного иммунитета пациентов с хроническим полипозным риносинуситом. *Медицинская иммунология*. 2017; 19(6): 731–8. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2017-6-731-738>
 27. Батура А.П., Романенко Э.Е., Леонова А.Ю., Ярцева А.С., Савлевич Е.Л., Мокроносова М.А. Доминирование *Staphylococcus aureus* в микробиоценозе полости носа у детей и взрослых с инфекционным и аллергическим ринитом. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2015; 92(1): 72–4.
- REFERENCES
1. Kozlov V.S., Savlevich E.L. Chronic rhinosinusitis with nasal polyps. The recent trend in the studies of the pathogenesis, diagnosis and treatment of this disease. *Vestnik otorinolaringologii*. 2015; 80(4): 95–9. <https://doi.org/10.17116/otorino201580495-99> (in Russian)
 2. Egorov V.I., Savlevich E.L. The role of innate immunity in the development of chronic rhinosinusitis and perspectives of its conservative management. *Al'manakh klinicheskoy meditsiny*. 2016; 44(7): 850–6. <https://doi.org/10.18786/2072-0505-2016-44-7-850-856> (in Russian)
 3. Matsuwaki Y., Wada K., White T., Moriyama H., Kita H. *Alternaria* fungus induces the production of GM-CSF, interleukin-6 and interleukin-8 and calcium signaling in human airway epithelium through protease-activated receptor 2. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2012; 158(1): 19–29. <https://doi.org/10.1159/000337756>
 4. Sabirov A., Hamilton R.G., Jacobs J.B., Hillman D.E., Lebowitz R.A., Watts J.D. Role of local immunoglobulin E specific for *Alternaria alternata* in the pathogenesis of nasal polyposis. *Laryngoscope*. 2008; 118(1): 4–9. <https://doi.org/10.1097/MLG.0b013e3181567a7a>
 5. Aydil U., Kalkanci A., Ceylan A., Berk E., Kuştimur S., Uslu S. Investigation of fungi in massive nasal polyps: microscopy, culture, polymerase-chain reaction, and serology. *Am. J. Rhinol.* 2007; 21(4): 417–22. <https://doi.org/10.2500/ajr.2007.21.3054>
 6. Ebbens F.A., Scadding G.K., Badia L., Hellings P.W., Jorissen M., Mullol J., et al. Amphotericin B nasal lavages: not a solution for patients with chronic rhinosinusitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006; 118(5): 1149–56. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.07.058>
 7. Cho G.S., Moon B.J., Lee B.J., Gong C.H., Kim N.H., Kim Y.S., et al. High rates of detection of respiratory viruses in the nasal washes and mucosae of patients with chronic rhinosinusitis. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 51(3): 979–84. <https://doi.org/10.1128/JCM.02806-12>
 8. Fokkens W.J., Lund V.J., Mullol J., Bachert C., Alobid I., Baroody F., et al. EPOS 2012: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. A summary for otorhinolaryngologists. *Rhinology*. 2012; 50(1): 1–12. <https://doi.org/10.4193/Rhino12.000>
 9. Abshirini H., Makvandi M., Seyyed Ashrafi M., Hamidifard M., Saki N. Prevalence of rhinovirus and respiratory syncytial virus among patients with chronic rhinosinusitis. *Jundishapur J. Microbiol.* 2015; 8(3): e20068. <https://doi.org/10.5812/jjm.20068>
 10. Zaravinos A., Bizakis J., Spandidos D.A. Prevalence of human papilloma virus and human herpes virus types 1-7 in human nasal polyposis. *J. Med. Virol.* 2009; 81(9): 1613–9. <https://doi.org/10.1002/jmv.21534>
 11. Pei F., Chen X.P., Zhang Y., Wang Y., Chen Q., Tan X.J., et al. Human papillomavirus infection in nasal polyps in a Chinese population. *J. Gen. Virol.* 2011; 92(Pt. 8): 1795–9. <https://doi.org/10.1099/vir.0.031955-0>
 12. Vickery T.W., Ramakrishnan V.R., Suh J.D. The role of *Staphylococcus aureus* in patients with chronic sinusitis and nasal polyposis. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2019; 19(4): 21. <https://doi.org/10.1007/s11882-019-0853-7>
 13. Conley D.B., Tripathi A., Seiberling K.A., Schleimer R.P., Suh L.A., Harris K., et al. Superantigens and chronic rhinosinusitis: skewing of T-cell receptor V beta-distributions in polyp-derived CD4+ and CD8+ T cells. *Am. J. Rhinol.* 2006; 20(5): 534–9. <https://doi.org/10.2500/ajr.2006.20.2941>
 14. Chegini Z., Didehdar M., Khoshbayan A., Karami J. The role of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *Cell Commun. Signal.* 2022; 20(1): 29. <https://doi.org/10.1186/s12964-022-00839-x>
 15. Foreman A., Holtappels G., Psaltis A.J., Jervis-Bardy J., Field J., Wormald P.J., et al. Adaptive immune responses in *Staphylococcus aureus* biofilm-associated chronic rhinosinusitis. *Allergy*. 2011; 66(11): 1449–56. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2011.02678.x>
 16. Singhal D., Psaltis A.J., Foreman A., Wormald P.J. The impact of biofilms on outcomes after endoscopic sinus surgery. *Am. J. Rhinol. Allergy*. 2010; 24(3): 169–74. <https://doi.org/10.2500/ajra.2010.24.3462>
 17. Bondareva G.P., Terekhova A.O. The role of infection in the development of polypous rhinosinusitis in patients with bronchial asthma. *Vestnik otorinolaringologii*. 2010; (3): 9–11. (in Russian)
 18. Haddadin R.N., Saleh S.A., Ayyash M.A., Collier P.J. Occupational exposure of pharmaceutical workers to drug actives and excipients and their effect on *Staphylococcus* spp. nasal carriage and antibiotic resistance. *Int. J. Occup. Environ. Health*. 2013; 19(3): 207–14. <https://doi.org/10.1179/2049396713Y.0000000035>
 19. Savlevich E.L., Cherenkova V.A., Molodnitskaya A.Yu. Basic principles for the treatment of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Meditsinskiy sovet*. 2020; (16): 73–8. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2020-16-73-78> (in Russian)
 20. Lopatin A.S., Azizov I.S., Kozlov R.S. Microbiome of the nasal cavity and the paranasal sinuses in health and disease (literature review). *Rossiyskaya rinologiya*. 2021; 29(1): 23–30. <https://doi.org/10.17116/rosrino20212901123> (in Russian)
 21. Kolenchukova O.A., Smirnova S.V., Lapteva A.M. Nasal mucous membrane microflora in patients with polypous rhinosinusitis. *Infektsiya i иммунитет*. 2016; 6(4): 366–72. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2016-4-366-372> (in Russian)
 22. Savlevich E.L., Egorov V.I., Shachnev K.N., Tatarsenko N.G. The analysis of polypous rhinosinusitis treatment regimens

- in the Russian Federation. *Rossiyskaya otorinolaringologiya*. 2019; 18(1): 124–34. <https://doi.org/10.18692/1810-4800-2019-1-124-134> (in Russian)
23. Head K., Chong L.Y., Pirochchai P., Hopkins C., Philpott C., Schilder A.G., et al. Systemic and topical antibiotics for chronic rhinosinusitis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2016; 4(4): CD011994. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011994>
 24. Bhattacharyya N., Kepnes L.J. Medications prescribed at ambulatory visits for nasal polyposis. *Am. J. Rhinol. Allergy*. 2013; 27(6): 479–81. <https://doi.org/10.2500/ajra.2013.27.3969>
 25. Cope E.K., Goldberg A.N., Pletcher S.D., Lynch S.V. Compositionally and functionally distinct sinus microbiota in chronic rhinosinusitis patients have immunological and clinically divergent consequences. *Microbiome*. 2017; 5(1): 53. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0266-6>
 26. Savlevich E.L., Khaydukov S.V., Kurbacheva O.M., Bondareva G.P., Shachnev K.N., Simbirtsev A.S. Characteristics of cellular immune status in the patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Meditinskaya immunologiya*. 2017; 19(6): 731–8. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2017-6-731-738> (in Russian)
 27. Batur A.P., Romanenko E.E., Leonova A.Yu., Yartseva A.S., Savlevich E.L., Mokronosova M.A. Domination of *Staphylococcus aureus* in microbiocenosis of nasal cavity in children and adults with infectious and allergic rhinitis. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2015; 92(1): 72–4. (in Russian)

Информация об авторах

Савлевич Елена Леонидовна — д.м.н., доцент каф. оториноларингологии ЦГМА, Москва, Россия; с.н.с. отд. оториноларингологии МОНКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия, savllena@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-4031-308X>

Егоров Виктор Иванович — д.м.н., профессор, зав. каф. оториноларингологии МОНКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8825-5096>

Савушкина Елизавета Юрьевна — аспирант каф. оториноларингологии МОНКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9681-1304>

Зурочка Александр Владимирович — д.м.н., профессор, в.н.с. лаб. иммунологии воспаления Института иммунологии и физиологии, Екатеринбург, Россия; профессор каф. пищевых и биотехнологий ЮУрГУ, Челябинск, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4371-4161>

Герасимов Андрей Николаевич — д.ф.-м.н., зав. каф. медицинской информатики и статистики Института цифровой медицины ПМГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовского Университета), Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4549-7172>

Митрофанова Елизавета Сергеевна — аспирант кафедры клинической иммунологии и аллергологии ФНККЦ, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3379-8699>

Любимова Елена Валерьевна — врач-оториноларинголог ООО «ЛОР клиника», Екатеринбург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9167-2053>

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

Статья поступила в редакцию 09.06.2022;
принята к публикации 20.07.2022;
опубликована 30.08.2022

Information about the authors

Elena L. Savlevich — D. Sci. (Med.), Central State Medical Academy, Moscow, Russia; senior researcher, Department of otorhinolaryngology, M.F. Vladimirovsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russia, savllena@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-4031-308X>

Victor I. Egorov — D. Sci. (Med.), Professor, Head, Department of otorhinolaryngology, M.F. Vladimirovsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8825-5096>

Elizaveta Yu. Savushkina — postgraduate student, Department of otorhinolaryngology, M.F. Vladimirovsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9681-1304>

Alexander V. Zurochka — D. Sci. (Med.), Professor, leading researcher, Inflammation immunology laboratory, Institute of Immunology and Physiology, Ekaterinburg, Russia; Professor, Department of Food and Biotechnology, South Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4371-4161>

Andrey N. Gerasimov — D. Sci. (Phys.-Math.), Professor, Head, Department of Medical Informatics and Statistics, Institute of Digital Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4549-7172>

Elizaveta S. Mitrofanova — postgraduate student, Department of clinical immunology and allergology, Academy of Postgraduate Education of the Federal Research and Clinical Center, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3379-8699> SPIN-код 2105-3152

Elena V. Lyubimova — otorhinolaryngologist, LLC «LOR clinic», Yekaterinburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9167-2053>

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

The article was submitted 09.06.2022;
accepted for publication 20.07.2022;
published 30.08.2022



Первый случай выявления *Listeria monocytogenes* сиквенс-типов ST7, ST20, ST425 в сточных водах при обследовании водных объектов Вологодской области

Алексеева Е.А.¹, Полосенко О.В.², Фурсова Н.К.², Асташкин Е.И.², Борзенков В.Н.², Кисличкина А.А.², Коломбет Л.В.^{2✉}, Шепелин А.П.², Миронов А.Ю.³

¹Центр гигиены и эпидемиологии в Вологодской области, Вологда, Россия;

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

³Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского, Москва, Россия

Аннотация

Введение. *Listeria monocytogenes* относится к числу значимых патогенов человека, вызывает различные формы листериоза, в том числе пищевые инфекции, менингиты, неонатальный сепсис, аборт. Листерии распространены во всех регионах мира.

Целью исследования явилось проведение микробиологического мониторинга *Listeria monocytogenes* в водных объектах вблизи животноводческих предприятий Вологодского района Вологодской области.

Материалы и методы. Выделение культур бактерий осуществляли титрационным и фильтрационным методами, идентифицировали с применением бактериологического, серологического методов, автоматизированных приборных методов, полногеномного секвенирования и биоинформационного анализа.

Результаты. Из 12 проанализированных образцов водных источников (6 образцов — сточные воды, 4 — речная вода, 2 — ливневые воды) выделены 3 штамма *L. monocytogenes* и один штамм *L. innocua*. Полногеномное секвенирование 3 штаммов *L. monocytogenes* установило их принадлежность к эволюционной линии II, к 3 сиквенс-типам и 2 серогруппам: ST425(1/2a-3a), ST20(1/2a-3a) и ST7(4a-4c). Показана принадлежность штаммов к категории множественно лекарственно-устойчивых, резистентных к 3 функциональным группам антимикробных препаратов (тетрациклинам, макролидам, сульфаниламидам). В геномах штаммов идентифицированы гены антибиотикорезистентности (*fosX*, *pbp-like*, *lin*, *norB*, *sul*), острова патогенности *LIP1-1*, *LIP1-2*, гены вирулентности *inlABCJ*, *oatA*, *ami*, *gtcA*, *vip*, *lisK*. У 1 штамма выявлен остров стрессоустойчивости *SSI-1*.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о контаминации водных источников вблизи животноводческих предприятий штаммами *L. monocytogenes*, обладающими высоким потенциалом патогенности, который может привести к вспышкам листериоза у людей, что указывает на необходимость тщательного мониторинга водных источников на наличие возбудителя листериоза и проведение профилактических и противозидемических мероприятий.

Ключевые слова: *Listeria monocytogenes*, мониторинг, генетические линии, сиквенс-типы, гены вирулентности, гены стрессоустойчивости

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

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

Для цитирования: Алексеева Е.А., Полосенко О.В., Фурсова Н.К., Асташкин Е.И., Борзенков В.Н., Кисличкина А.А., Коломбет Л.В., Шепелин А.П., Миронов А.Ю. Первый случай выявления *Listeria monocytogenes* сиквенс-типов ST7, ST20, ST425 в сточных водах при обследовании водных объектов Вологодской области. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(4):453–464.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-266>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-266>

The first case of detection of *Listeria monocytogenes* sequence types ST7, ST20, ST425 in wastewater during an investigation of water bodies in the Vologda region

Elena A. Alekseeva¹, Olga V. Polosenko², Nadezhda K. Fursova², Evgeny I. Astashkin², Valery N. Borzenkov², Angelina A. Kislichkina², Liubov V. Kolombet^{2&3}, Anatoly P. Shepelin², Andrey Yu. Mironov³

¹Center of Hygiene and Epidemiology in the Vologda region, Vologda, Russia;

²State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia;

³G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. *Listeria monocytogenes* is an important human pathogen causing various forms of listeriosis, including foodborne infections, meningitis, neonatal sepsis, and abortion. *Listeria* are common all over the world. **The purpose** of the study was to conduct microbiological monitoring of *L. monocytogenes* in water reservoirs near livestock premises in the Vologda district of the Vologda region.

Materials and methods. Bacterial cultures were isolated using two methods, titration and filtration, followed by analysis using methods of conventional bacteriology, serotyping, and species identification by instrumental procedures such as whole genome sequencing, and bioinformatic analysis.

Results. Three isolates of *L. monocytogenes* and one isolate of *Listeria innocua* were isolated from 12 analyzed water samples (wastewater — 6, river water — 4, and storm water — 2 samples). whole genome sequencing of three *L. monocytogenes* strains attributed them to the evolutionary line II, and to three sequence types and two serogroups ST425(1/2a-3a), ST20(1/2a-3a), ST7 (4a-4c). The strains are shown to belong to multiple drug resistant ones conferring resistance to three functional groups of antibacterials such as tetracyclines, macrolides, and sulfonamides. Antibiotic resistance genes (*fox*, *psp-like*, *lin*, *norB*, *sul*), virulence Islands LIPI-1 and LIPI-2, and virulence genes *inlABCJ*, *oatA*, *ami*, *gtcA*, *vip*, and *lisK* in genomes of the strain were identified. Stress tolerance Island SSI-1 was identified in one strain.

Conclusions. The data obtained indicate contamination of water sources near the livestock premises with *L. monocytogenes* strains possessing high pathogenic potentiality for outbreaks of listeriosis in humans. This shows the necessity of careful monitoring of water sources for the presence of the causative agent of listeriosis as well as the implementing of anti-epidemic measures.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, monitoring, genetic lines, sequence types, virulence genes, stress tolerance genes

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

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

For citation: Alekseeva E.A., Polosenko O.V., Fursova N.K., Astashkin E.I., Borzenkov V.N., Kislichkina A.A., Kolombet L.V., Shepelin A.P., Mironov A.Yu. The first case of detection of *Listeria monocytogenes* sequence types ST7, ST20, ST425 in wastewater during an investigation of water bodies in the Vologda region. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(4):453–464.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-266>

Введение

Listeria monocytogenes относится к числу проблемных патогенов человека, вызывает различные формы листериоза, в том числе менингиты, неонатальный сепсис, аборт. Заболеваемость листериозом в мире составляет 0,30–0,46 случая на 100 тыс. населения с показателем летальности до 21% [1, 2].

Грамположительные бактерии *L. monocytogenes* относятся к роду *Listeria*, наряду с другим патогенным видом *L. ivanovii*, непатогенными видами *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi* и др. [3, 4]. Листерии широко распространены в разных экологических системах. Они выделяются из поч-

венных и водных экосистем, от животных, людей, из пищевых продуктов, окружающей среды на животноводческих предприятиях и предприятиях пищевой промышленности. *L. monocytogenes* патогенна для человека и животных, *L. ivanovii* — только для животных, но в редких случаях может вызвать заболевание у человека. Описаны случаи выделения *L. ivanovii* из организма здорового животного или человека-бактерионосителя, из окружающей среды [3, 5].

Распространению листерий способствует широкомасштабная хозяйственная деятельность человека: внедрение новых технологий возделывания почвы, строительство животноводческих комплек-

сов, комбикормовых заводов, централизованных предприятий по переработке и реализации сырья животного происхождения, продовольственных складов и хранилищ. В группе риска по возможности заболевания листериозом находятся беременные женщины, новорождённые дети, лица пожилого возраста, иммунокомпрометированные лица. Листериоз часто регистрируется у работников цехов первичной переработки на птицефабриках и мясокомбинатах [3, 4, 6]. Листерии распространены во всех регионах мира, в том числе в различных климатических поясах и даже за Полярным кругом, заболеваемость листериозом отмечается в 56 странах [7]. Одним из основных факторов передачи листерий человеку и животных является вода [8, 9]. Благодаря своим высоким адаптивным свойствам в широком температурном диапазоне, влажности, pH среды, листерии циркулируют в почве, пресной и морской воде [3, 10].

Главная задача санитарной охраны водных объектов базируется на предотвращении сброса в них сточных вод, контаминированных бактериями [11]. Отсутствует методологическая база выделения культур *L. monocytogenes* из сточных вод. Недостаточно освещён вопрос о распространении листерий в пресных водоёмах на территории России. Отсутствуют данные по внутривидовому типированию *L. monocytogenes* и принадлежности к генетическим линиям (сиквенс-типам).

Цель исследования — индикация *L. monocytogenes* в водных объектах Вологодской области и изучение их биологических и молекулярно-генетических свойств, в том числе чувствительности к антимикробным препаратам (АМП), наличия генетических детерминант антибиотикорезистентности, патогенности, стрессоустойчивости, внутривидового мультилокусного сиквенс-типирования.

Материалы и методы

Объекты исследования

Обследованы 12 образцов водных объектов, расположенных вблизи животноводческих предприятий Вологодского района Вологодской области, в том числе образцы сточных вод ($n = 6$), речной воды ($n = 4$), ливневых вод ($n = 2$). Образцы воды отобраны в осенний период 2018 г. в рамках производственного микробиологического контроля поверхностных вод ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Вологодской области», согласно СанПиН 2.1.5.980-00¹.

¹ СанПиН 2.1.5.980-00. 2.1.5. «Водоотведение населённых мест, санитарная охрана водных объектов. Гигиенические требования к охране поверхностных вод. Санитарные правила и нормы» (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 22.06.2000) (с изм. от 04.02.2011, с изм. от 25.09.2014).

Питательные среды. Для накопления листерий в образцах использован селективный накопительный бульон «UVM» («Merck»), «Бульон Фрейзера, основа» (ГНЦ ПМБ). В качестве дифференциально-диагностических применены среды «*Listeria* agar (base) acc. OTTAVIANI and AGOSTI» («Merck»), «ПАЛКАМ агар» (ГНЦ ПМБ). Штаммы листерий культивировали на средах: «Мясо-пептонный агар» с 1% глюкозы (ГНЦ ПМБ), «Триптон-соевый агар, ТСА (ГНЦ ПМБ), «Мясо-пептонный бульон, МПБ» с 1% глюкозы (ГНЦ ПМБ), «Tryptone Soya Yeast Extract Broth» («HiMedia»), «*L. mono* Blood Agar Base» («HiMedia») [12, 13].

Титрационный и фильтрационный методы посева образцов воды

При выделении и идентификации *L. monocytogenes* из водных объектов в качестве основы использованы схемы и питательные среды для выделения патогенных листерий из пищевых продуктов, согласно утверждённому в России нормативным документам^{2,3}.

Посевной объём образца составлял 1000 мл, материал сеяли на питательные среды титрационным и фильтрационным способами. Для посева титрационным способом использованы 2 объёма воды по 250 мл, 4 объёма по 100 мл, 10 объёмов по 10 мл, при этом воду сеяли сразу в среды накопления и инкубировали при 30°C в течение 24–48 ч. Для фильтрационного способа образцы делили на 4 объёма по 250 мл для более лёгкого прохождения воды через фильтры. При видимом загрязнении образец делили на 5 и/или 10 равных частей. Отмеренные объёмы воды фильтровали через мембранные фильтры со средним диаметром пор 0,45 мкм и диаметром фильтрующей поверхности 37 мм с использованием аппарата для фильтрования. После фильтрации мембранные фильтры вносили в 50–100 мл среды накопления и инкубировали в термостате при температуре $30 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24 ч. Дальнейшие этапы исследования для титрационного и фильтрационного способов одинаковы: после предварительного обогащения пересевали 0,1 мл материала в 9 мл среды для вторичного накопления с последующей инкубацией при 37°C в течение 24–48 ч.

Идентификация листерий

Видовую идентификацию листерий осуществляли согласно инструкциям производителей: с помощью биохимической тест-системы «API *Listeria*»

² ГОСТ 32031-2012 (ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004, NEQ) Продукты пищевые. Методы выявления и определения бактерий *Listeria monocytogenes*. М.; 2014.

³ МУК 4.2.1122-02 Организация контроля и методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах. М.; 2002.

(«bioMérieux»), ПЦР-тест-системы «АмплиСенс *Listeria monocytogenes*-EPh» (ЦНИИ эпидемиологии), «Латексной тест-системы *Listeria monocytogenes*» (ГНЦ ПМБ) [14].

Молекулярно-генетическая идентификация *L. monocytogenes*

Видовую идентификацию листерий подтверждали с помощью экспериментальных ПЦР тест-систем (ГНЦ ПМБ): для определения рода *Listeria* применяли «ПЦР тест-систему *Listeria* spp.»; для определения видов листерий — «ПЦР тест-систему *Listeria monocytogenes*», «ПЦР тест-систему *Listeria innocua*», «ПЦР тест-систему *Listeria ivanovii*», «ПЦР тест-систему *Listeria welshimeri*», «ПЦР тест-систему *Listeria siligeri*» и «ПЦР тест-систему *Listeria greyi*». В качестве ДНК-матрицы использованы термолизаты исследуемых культур. Визуализацию продуктов амплификации осуществляли с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле. В качестве референс-штаммов использованы штаммы *L. monocytogenes* ATCC13932, *L. innocua* ATCC33090, *L. ivanovii* ATCC19119, *L. welshimeri* В7382, *L. siligeri* ATCC35967, *L. greyi* ATCC25400, полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск».

Чувствительность к АМП

Минимальные подавляющие концентрации (МПК) ампициллина, амоксициллина, меропенема, тетрациклина, кларитромицина, амикацина, бисептола, ципрофлоксацина («HiMedia») определяли методом микроразведений в бульоне. Интерпретацию результатов осуществляли в соответствии с рекомендациями EUCAST⁴. Принадлежность к категории множественной лекарственной резистентности (MDR) определяли в соответствии с критериями А.Р. Magiorakos и соавт. [15].

ПЦР-серотипирование

Серотипирование штаммов осуществляли с помощью мультиплексной ПЦР по методу М. Doumith и соавт. [16].

Генотипирование штаммов *L. monocytogenes*

Мультилокусное сиквенс-типирование осуществляли по схеме Института Пастера, основанной на анализе нуклеотидных последовательностей 7 генов «домашнего хозяйства»: *abcZ* (ABC-транспортиёр), *bglA* (β-глюкозидазы), *cat* (каталазы), *dapE* (сукцинилдиаминимелат десукцинилазы), *dat* (аминотрансферазы D-аминокислоты), *ldh* (L-лактатдегидрогеназы), *lhkA* (гистидинкиназы) [17].

Полногеномное секвенирование штаммов *L. monocytogenes*

Секвенирование осуществляли на платформе «Illumina MiSeq» с использованием наборов «Nextera DNA Library Preparation Kit» («Illumina»), «MiSeq Reagent Kit sv3» («Illumina»), согласно инструкциям производителя. Полученные единичные прочтения собирали в контиги с использованием программного обеспечения «SPAdes 3.9.0».

Детекция генов антибиотикорезистентности, патогенности, стрессоустойчивости в геномах *L. monocytogenes*

В геномах штаммов *L. monocytogenes* идентифицированы гены антибиотикорезистентности *fosX*, *lmo0441*, *lmo0919*, *norB*, *lmo0224*; гены островов патогенности LIPI-1 (*prfA*, *hly*, *plcA*, *plcB*, *mpl*, *actA*), LIPI-2 (*inlABCJ*), LIPI-3 (*lIsAXGHBYDP*), LIPI-4 (*licABC*, *lm900558-70013*, *glvA*); гены интерналинов (*inlEFGHIKP*); другие гены патогенности (*oatA*, *ami*, *gtcA*, *vip*, *lisK*); гены островов стрессоустойчивости SSI-1 (*lmo0444*, *lmo0445*, *lmo0446*, *lmo0447*, *lmo0448*), SSI-2 (*lin0464*, *lin0465*) с помощью веб-ресурса базы данных BIGSdb-Lm⁵.

Результаты

Выделение культур *L. monocytogenes*

Из образцов воды титрационным и фильтрационным способами выделены штаммы *Listeria* spp.

Наличие листерий выявляли визуально по характеру роста на селективных бульонах и дифференциально-диагностических средах.

При селективном обогащении в среде UVM *Listeria* spp. и через 24 и 48 ч инкубации при 30 ± 1°C наблюдалось незначительное диффузное помутнение среды. Наличие листерий на бульоне Фрейзера подтверждалось изменением цвета среды.

Затем из всех исследуемых пробирок проводили высевы материала из верхнего слоя питательной среды петлёй на селективно-диагностические питательные среды. На среде ПАЛКАМ агар через 24 ч инкубации листерии формировали мелкие, серовато-зелёные или оливково-зелёные колонии, диаметром 0,5–1,0 мм, через 48 ч — диаметром 1–2 мм с чёрным ореолом. На среде ALOA — предположительно *L. monocytogenes* образовывали типичные сине-зелёные колонии, окружённые непрозрачным ореолом, *L. innocua* — в виде сине-зелёных колоний без зоны помутнения.

На кровяном агаре вокруг колоний, предположительно являющихся *L. monocytogenes*, отмечено наличие зон β-гемолиза; вокруг колоний *L. innocua*, зоны β-гемолиза отсутствовали.

⁴ URL: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints

⁵ URL: https://bigsdb.pasteur.fr/cgi-bin/bigsdb/bigsdb.pl?db=pubmlst_listeria_seqdef

При исследовании материала фильтрационным методом рост бактерий рода *Listeria* наблюдался через 24 ч, при использовании титрационного метода — через 48 ч.

По культуральным свойствам на питательных средах из 12 образцов отобраны культуры с типичным для листерий ростом (табл. 1). Морфология выделенных культур листерий при использовании как зарубежных, так и отечественных сред идентична: короткие палочки с закруглёнными концами, располагающиеся поодиночке или в виде коротких цепочек; грамположительные, спор и капсул не образуют, имеют несколько перитрихально расположенных жгутиков.

Ферментативные свойства культур

При изучении биохимических свойств штаммов *Listeria* spp. с помощью API тест-системы установлено, что культуры, выделенные из сточных вод (образцы № 2934, 2965, 2966), гидролизуют эскулин, ферментируют α -маннозид, D-арабит, рамнозу, метил- α -D-глюкопиранозиды, не ферментируют ксилозу, рибозу, глюкозо-1-фосфат, тагалоу. Культуры идентифицированы как *L. monocytogenes*. При изучении биохимических свойств образца № 2889 выявлен гидролиз эскулина, ферментация α -маннозида, D-арабита, рамнозы, метил- α -D-глюкопиранозидов, отсутствие ферментации ксилозы, рибозы, глюкозо-1-фосфата, тагалоу. Изолят № 2889 идентифицирован как *L. innocua*.

После постановки дополнительных тестов для всех эскулинположительных культур микроорганизмов, выросших на среде ПАЛКАМ, и лецитинообразующих культур на среде АЛОА — по Оттавиани и Агости, подтверждена принадлежность культур из образцов № 2934, 2965, 2966, выделенных из сточных вод, к *L. monocytogenes*, а культуры из образца № 2889, выделенного из речной воды, — к *L. innocua*. В остальных образцах воды из водных объектов Вологодского района Вологодской области бактерии рода *Listeria* не обнаружены (табл. 1).

Идентификации *L. monocytogenes* и *L. innocua* с помощью ПЦР и латексной тест-систем

Принадлежность 4 культур из образцов № 2934, 2965, 2966, 2889 к роду *Listeria* подтверждена с помощью экспериментальной тест-системы «ПЦР тест-система *Listeria* spp.». У 3 культур из образцов № 2934, 2965, 2966 подтверждена принадлежность к виду *L. monocytogenes* как «ПЦР тест-системой *Listeria monocytogenes*», так и в реакции латекс-агглютинации на стекле с помощью «Латексной тест-системы *Listeria monocytogenes*». У культуры из образца № 2889 подтверждена принадлежность к виду *L. innocua* с помощью «ПЦР тест-системы *Listeria innocua*».

Чувствительность к АМП

На основании определения МПК АМП три штамма *L. monocytogenes* отнесены к категории MDR, в соответствии с критериями [15], т.е. устойчивы к АМП 3 и более классов. Все штаммы были устойчивы к тетрациклам (тетрациклину), макролидам (кларитромицину) и сульфаниламидам (бисептолу). Эти штаммы чувствительны к меропенему, амикацину и цiproфлоксацину (табл. 2). В геномах всех штаммов идентифицировали 5 генов антибиотикорезистентности:

- *fosX* (*lmo1702*), кодирующий белок резистентности к фосфомицину;
- *pbp-like* (*lmo0441*), кодирующий пенициллин-связывающий белок, определяющий устойчивость к β -лактамам;
- *lin* (*lmo0919*), определяющий устойчивость к макролидам-линкозамидам-стрептограминам;
- *norB*, кодирующий NO-редуктазу, ассоциированную с устойчивостью к фторхинолонам;
- *sul* (*lmo0224*), детерминирующий устойчивость к сульфаниламидам.

Идентифицированные гены антибиотикорезистентности вносят вклад в формирование MDR-фенотипа изученных штаммов.

Генетические линии штаммов *L. monocytogenes*

Штаммы *L. monocytogenes* 2934, 2965, 2966 принадлежат к одной эволюционной линии II, но к разным сиквенс-типам: ST425, ST20, ST7 соответственно (табл. 3). Это первый случай выявления данных сиквенс-типов *L. monocytogenes* у штаммов, выделенных из сточных вод.

Острова патогенности и стрессоустойчивости в геномах *L. monocytogenes*

При анализе полногеномных последовательностей штаммов *L. monocytogenes* 2934, 2965, 2966 показано, что гены островов патогенности *LIP1-1* и *LIP1-2* присутствуют у всех 3 штаммов, гены *LIP1-3* и *LIP1-4* отсутствуют. На этом основании можно предположить, что штаммы не являются гипервирулентными, т.к. ранее отмечено, что наличие островов патогенности *LIP1-3* и *LIP1-4* характерно для гипервирулентных штаммов *L. monocytogenes* [18]. Гены кластера интерналинов *inlE*, *inlI*, *inlK*, *inlP* детектированы у всех штаммов, гены *inlF*, *inlG* — у штаммов *L. monocytogenes* 2934 и 2965, ген *inlH* — у штаммов *L. monocytogenes* 2934 и 2966. Прочие гены патогенности листерий (*oatA*, *ami*, *gtcA*, *vip*, *lisK*) детектированы у всех 3 штаммов, кроме гена *vip*, который отсутствовал у штамма *L. monocytogenes* 2966.

Остров стрессоустойчивости *SSI-1*, ассоциированный с устойчивостью к кислотам, солям и обеспечивающий рост в пищевых продуктах [19], обнаружен у штамма *L. monocytogenes* 2966 сиквенс-ти-

Таблица 1. Анализ образцов воды бактериологическим и биохимическим методами
Table 1. Analysis of water samples by bacteriological and biochemical methods

Образец Sample	Источник выделения Isolation source	Рост на бульоне UVM Growth in UVM broth	Рост на бульоне Фрейзера, основа Fraser Broth Base	Рост на агаре ALOA по Оттавиани и Агости Growth on ALOA agar based on Ottaviani & Agosti formula	Рост на ПАЛКАМ агаре Growth on PALCAM agar	β-Гемолиз β-Hemolysis	Ферментация ксилитозы Xylose fermentation	Ферментация рамнозы Rhamnose fermentation	Ферментация маннита Mannitol fermentation	Заключение Conclusion
2934	Сточные воды Waste water	Рост в виде помутнения Growth opacity	Помутнение, изменение цвета Opacity, color change	Сине-зелёные колонии, окружённые непрозрачным ореолом Blue-green colonies surrounded by an opaque halo	Оливково-зелёные колонии с чёрным ореолом Olive-green colonies with a black halo	+	-	+	-	<i>L. monocytogenes</i>
2967	Сточные воды Waste water	Нет роста No growth	Помутнение, изменение цвета Opacity, color change	Нет роста No growth	Нет роста No growth					Листерии не обнаружены ND
2965	Сточные воды Waste water	Рост в виде помутнения Growth opacity	Помутнение, изменение цвета Opacity, color change	Сине-зелёные колонии, окружённые непрозрачным ореолом Blue-green colonies surrounded by an opaque halo	Оливково-зелёные колонии с чёрным ореолом Olive-green colonies with a black halo	+	-	+	-	<i>L. monocytogenes</i>
2968	Сточные воды Waste water	Нет роста No growth	Нет роста No growth	Нет роста No growth	Нет роста No growth					Листерии не обнаружены ND
2966	Сточные воды Waste water	Рост в виде помутнения Growth opacity	Помутнение, изменение цвета Opacity, color change	Сине-зелёные колонии, окружённые непрозрачным ореолом Blue-green colonies surrounded by an opaque halo	Оливково-зелёные колонии с чёрным ореолом Olive-green colonies with a black halo	+	-	+	-	<i>L. monocytogenes</i>
2990	Сточные воды Waste water	Нет роста No growth	Нет роста No growth	Нет роста No growth	Нет роста No growth					Листерии не обнаружены ND
2888	Речная вода River water	Нет роста No growth	Нет роста No growth	Нет роста No growth	Нет роста No growth					Листерии не обнаружены ND
2889	Речная вода River water	Рост в виде помутнения Growth opacity	Помутнение, изменение цвета Opacity, color change	Сине-зелёные колонии Blue-green colonies	Оливково-зелёные колонии с чёрным ореолом Olive-green round small colonies with a black halo	-	-	-	-	<i>L. innocua</i>

Окончание табл. 1 / End of the Table 1

Образец Sample	Источник выделения Isolation source	Рост на бульоне Фрейзера, основа UVM Growth in Fraser Broth Base	Рост на агаре ALOA по Оттавиани и Агости Growth on ALOA agar based on Ottaviani & Agosti formula	Рост на ПАЛКАМ агаре Growth on PALCAM agar	β-Гемоллиз β-Hemolysis	Ферментация ксилитозы Xylose fermentation	Ферментация рамнозы Rhamnose fermentation	Ферментация маннита Mannitol fermentation	Заключение Conclusion
3014	Речная вода River water	Нет роста No growth	Нет роста No growth	Нет роста No growth	Нет роста No growth	Нет роста No growth	Нет роста No growth	Нет роста No growth	Листерии не обнаружены ND
3015	Речная вода River water	Нет роста No growth	Нет роста No growth	Нет роста No growth	Нет роста No growth	Нет роста No growth	Нет роста No growth	Нет роста No growth	Листерии не обнаружены ND
3037	Ливневые воды Storm water	Нет роста No growth	Помутнение, изменение цвета Opacity, color change	Нет роста No growth	Нет роста No growth	Нет роста No growth	Нет роста No growth	Нет роста No growth	Листерии не обнаружены ND
3038	Ливневые воды Storm water	Нет роста No growth	Нет роста No growth	Нет роста No growth	Нет роста No growth	Нет роста No growth	Нет роста No growth	Нет роста No growth	Листерии не обнаружены ND

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3: «+» — наличие признака, «-» — отсутствие признака.
 Note. Here and in the Tables 2, 3: "+" — feature is present; "-" — feature is absent.

па ST7 эволюционной линии II, что согласуется с данными, полученными ранее в Китае [20]. Остров стрессоустойчивости *SSI-2*, обеспечивающий *L. monocytogenes* выживание в щелочных условиях и в условиях окислительного стресса [21], не выявлен ни у одного штамма (табл. 3). В геномах 2 штаммов серогруппы 1/2а-3а сиквенс-типов ST20 и ST425 не обнаружено ни одного острова стрессоустойчивости.

Обсуждение

В разных странах наблюдается устойчивая тенденция к увеличению доли антибиотикорезистентных штаммов *L. monocytogenes*: к ципрофлоксацину (2%), эритромицину (1%) в Австралии [22]; амоксицилину/клавуланату (6%), ко-тримоксазолу (10%), цефтриаксону (49%), клиндамицину (54%), ампициллину (83%), оксациллину (90%) в Польше [23, 24]; гентамицину (94%), стрептомицину (98%) в Ираке [25], что связывают с мутациями и горизонтальным переносом генов [26]. Повсеместно отмечается неблагоприятная тенденция распространения MDR-штаммов. В Японии с 2012 по 2017 г. отмечено увеличение доли MDR-штаммов *L. monocytogenes* с 46,7 до 82,6% [27]. В Египте в 2017 г. 88% штаммов *L. monocytogenes*, выделенных из молочных продуктов и от сотрудников молокоперерабатывающего предприятия, относились к категории MDR [28].

Выявление MDR-штаммов *L. monocytogenes* в сточных водах и идентификация в их геномах генетических детерминант антибиотикорезистентности указывает на неблагоприятную эпидемическую ситуацию по листериозу на территории вблизи животноводческих предприятий в обследованном регионе.

Сиквенс-типы ST7, ST20, ST425 *L. monocytogenes* преимущественно идентифицированы у штаммов, выделенных из пищевых продуктов [29], в образцах фекалий животных в национальных парках Новосибирской, Калужской, Тверской, Владимирской областей [30]. *L. monocytogenes* ST7 является аутохтонной генетической линией для России, характерной для изолятов из пищевых продуктов, объектов окружающей среды и от больных с перинатальным и неонатальным листериозом и менингитом [31]. ST7 определен у штаммов *L. monocytogenes*, выделенных от людей, сельскохозяйственных животных, грызунов на территории Восточной Европы, Центральной Азии, России [32].

Штаммы *L. monocytogenes* 2934 и 2965 отнесены к серогруппе 1/2а-3а, штамм *L. monocytogenes* 2966 — к серогруппе 4а-4с. Серогруппа 1/2а-3а *L. monocytogenes* ранее описана у 51,0% штаммов, выделенных из пищевых продуктов и окружающей среды животноводческих и птицеводческих ферм в Польше [24], 48,3% штаммов в Японии [27], 75,7%

Таблица 2. Фенотипы антибиотикорезистентности штаммов *L. monocytogenes*, выделенных из сточных вод — МПК антибактериальных препаратов, мг/л**Table 2.** Phenotypes of antibiotic resistance of *L. monocytogenes* strains isolated from waste water samples — antibacterial MICs, mg/l

Антибактериальные препараты Antibacterials	Штамм <i>L. monocytogenes</i> <i>L. monocytogenes</i> strain		
	2934	2965	2966
Ампициллин / Ampicillin	1 (S)	1 (S)	1 (S)
Амоксициллин / Amoxicillin	0,5 (S)	0,5 (S)	0,5 (S)
Меропенем / Meropenem	0,12 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)
Тетрациклин / Tetracycline	4 (R)	4 (R)	4 (R)
Кларитромицин / Clarithromycin	2 (R)	2 (R)	2 (R)
Амикацин / Amikacin	2 (S)	2 (S)	2 (S)
Бисептол / Biceptol	1/5 (R)	1/5 (R)	1/5 (R)
Ципрофлоксацин / Ciprofloxacin	0,12 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)
Множественная лекарственная устойчивость Multidrug resistance	Тетрациклины, макролиды, сульфаниламиды Tetracyclines, macrolides, sulphanylamides		

Примечание. R — резистентность; S — чувствительность.**Note.** R — resistance; S — susceptibility.**Таблица 3.** Характеристика геномов 3 штаммов *L. monocytogenes*, выделенных из сточных вод**Table 3.** Characteristics of genomes of 3 *L. monocytogenes* strains isolated from waste water samples

Параметр / Parameter	Штамм <i>L. monocytogenes</i> / <i>L. monocytogenes</i> strain		
	2934	2965	2966
Размер генома, т.п.н. / Genome size, kb	2834,6	2927,0	2849,7
GC-состав, % / GC composition, %	40	40	40
Количество контигов / Number of contigs	26	22	30
Количество генов / Number of genes	2830	2938	2833
Эволюционная линия / Evolutionary line	II	II	II
Сиквенс-тип / Sequence type	ST425	ST20	ST7
Серогруппа / Serogroup	1/2a-3a	1/2a-3a	4a-4c
Острова патогенности: / Pathogenicity islands:			
LIPI-1	+	+	+
LIPI-2	+	+	+
LIPI-3	–	–	–
LIPI-4	–	–	–
Гены интерналинов / Internalin genes	<i>inIEHIKP</i>	<i>inIEFGIKP</i>	<i>inIEFGHIKP</i>
Другие гены вирулентности Some other virulence genes	<i>oatA, ami, gtcA, vip, lisK</i>	<i>oatA, ami, gtcA, vip, lisK</i>	<i>oatA, ami, gtcA, lisK</i>
Острова стрессоустойчивости Stress resistance islands			
SSI-1	–	–	+
SSI-2	–	–	–

штаммов в Турции [33]. Серогруппа 4a-4c редко определялась у штаммов *L. monocytogenes*, выделенных из пищевых продуктов в Польше [24] и Турции [33] и от сельскохозяйственных животных в Ираке [34]. В литературе отсутствуют данные о выделениях *L. monocytogenes* серогрупп 1/2a-3a и 4a-4c из сточных вод.

Установлена гетерогенность 3 штаммов *L. monocytogenes*, выделенных из сточных вод Вологодской области, по наличию генетических детерминант антибиотикорезистентности, патогенности, стрессоустойчивости. Наличие в геномах штаммов генетических детерминант антибиотикорезистентности, островов патогенности и стрессоустойчиво-

сти, выявление генетического родства штаммов с эпидемически значимыми генетическими линиями *L. monocytogenes* свидетельствует о наличии у них высокого патогенного потенциала, который может быть реализован при попадании в организм человека, что указывает на необходимость использования молекулярно-генетических методов диагностики при оценке эпидемиологической ситуации по листериозу и разработке эффективных профилактических и противоэпидемических мероприятий.

Выводы

1. Разработанная и апробированная схема выделения патогенных для человека листерий, включающая титрационный и фильтрационный методы посева, позволила выделить из водных образцов штаммы *L. monocytogenes*. Полученные данные могут быть использованы в качестве основы для разработки нормативных документов для проведения микробиологического мониторинга *L. monocytogenes* в водных объектах.
2. Выявление контаминации сточных вод животноводческих предприятий MDR *L. monocytogenes*, несущих генетические детерминанты антибиотикорезистентности, патогенности, стрессоустойчивости, предполагает наличие у них высокого патогенного потенциала, способности вызвать вспышки листериоза среди людей.
3. Зафиксирован первый случай выделения из сточных вод штаммов *L. monocytogenes*, относящихся к генетическим линиям ST7, ST20, ST425, которые ранее выделялись в России и других странах от людей, из пищевых продуктов и окружающей среды.
4. Мультилокусное сиквенс-типирование штаммов *L. monocytogenes*, выделенных из сточных вод, может стать инструментом для выявления возможных источников инфекции людей во время вспышек листериозной инфекции, материалом для сравнения возбудителей, циркулирующих на различных территориях в разное время.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. 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.
2. European Food Safety Authority (EFSA). EU summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2015. *EFSA.* 2016; 14(12): e04634. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4634>
3. Воробьев А.А., Быков А.С., Бойченко М.Н. *Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: Учебник для студентов медицинских вузов.* М.: МИА; 2022.
4. Тартаковский И.С., Малеев В.В., Ермолаева С.А. *Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика.* М.: Медицина для всех; 2001.
5. Cao X., Wang Y., Wang Y., Li H., Luo L., Wang P., et al. Prevalence and characteristics of *Listeria ivanovii* strains in wild rodents in China. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2019; 19(1): 8–15. <https://doi.org/10.1089/vbz.2018.2317>
6. Lepe J.A. Current aspects of listeriosis. *Med. Clin. (Barc.).* 2020; 154(11): 453–8. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2020.02.001>
7. Фертиков В.И., Тихонов А.Н., Хрипунов Е.М., Егорова И.Ю. К формированию бактерий рода *Listeria* в эпоху позднего плейстоцена: факты и гипотезы. *Сельскохозяйственная биология.* 2009; 44(6): 18–26.
8. Бакулин Н.И., Батура А.П., Блинкова Л.П., Бурова С.А., Воропаева С.Д., Гавристова И.А. и др. *Клиническая лабораторная аналитика.* М.: Агат-Мед; 2003.
9. Meghdadi H., Khosravi A.D., Sheikh A.F., Alami A., Nassirabady N. Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* from environmental and clinical sources by culture and PCR-RFLP methods. *Iran J. Microbiol.* 2019; 11(1): 7–12.
10. Еськова А.И., Бузолева Л.С., Ким А.В., Богатыренко Е.А., Голозубова Ю.С. Биотические факторы среды, влияющие на выживаемость листерий в морских экосистемах. *Современные проблемы науки и образования.* 2016; (5): 294.
11. Ibrahim S., Azab El-Liethy M., Abia A.L.K., Abdel-Gabbar M., Mahmoud Al Zanaty A., Mohamed Kamel M. Design of a bioaugmented multistage biofilter for accelerated municipal wastewater treatment and deactivation of pathogenic microorganisms. *Sci. Total Environ.* 2020; 703: 134786. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134786>
12. Шепелин А.П., Полосенко О.В., Дятлов И.А. Листерии. Современный подход к проблеме выделения листерий с использованием питательных сред. *Справочник заведующего КДЛ.* 2018; (7): 33–48.
13. Полосенко О.В., Шепелин А.П., Марчихина И.И., Шолохова Л.П. Разработка питательных сред для выделения листерий. *Инфекция и иммунитет.* 2016; 6(3): 92. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2016-3>
14. Светоч Э.А., Ерусланов Б.В., Борзенков В.Н., Асташкин Е.И., Хаптанова Н.М., Карцев Н.Н. и др. Специфичность и чувствительность отечественной латексной тест-системы для идентификации *Listeria monocytogenes*. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии.* 2019; (37): 81–2.
15. Magiorakos A.P., Srinivasan A., Carey R.B., Carmeli Y., Falagas M.E., Giske C.G., et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012; 18(3): 268–81. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
16. Doumith M., Buchrieser C., Glaser P., Jacquet C., Martin P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(8): 3819–22. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.8.3819-3822.2004>
17. 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>
18. Maury M.M., Tsai Y.H., Charlier C., Touchon M., Chenal-Francois V., Leclercq A., et al. Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nat. Genet.* 2016; 48(3): 308–13. <https://doi.org/10.1038/ng.3501>
19. Patange A., O'Byrne C., Boehm D., Cullen P.J., Keener K., Bourke P. The effect of atmospheric cold plasma on bacterial stress responses and virulence using *Listeria monocytogenes* knockout mutants. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 2841. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02841>
20. Chen Y., Chen Y., Pouillot R., Dennis S., Xian Z., Luchansky J.B., et al. Genetic diversity and profiles of genes associated with virulence and stress resistance among isolates from the 2010–2013 interagency *Listeria monocytogenes* market basket survey. *PLoS One.* 2020; 15(4): e0231393. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231393>

21. Kaszoni-Rückerl I., Mustedanagic A., Muri-Klinger S., Brugger K., Wagner K.H., Wagner M., et al. Predominance of distinct *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* in recurrent contamination events at dairy processing facilities. *Microorganisms*. 2020; 8(2): 234. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020234>
22. Wilson A., Gray J., Chandry P.S., Fox E.M. Phenotypic and genotypic analysis of antimicrobial resistance among *Listeria monocytogenes* isolated from Australian food production chains. *Genes (Basel)*. 2018; 9(2): 80. <https://doi.org/10.3390/genes9020080>
23. Maćkiw E., Stasiak M., Kowalska J., Kucharek K., Korsak D., Postupolski J. Occurrence and characteristics of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meat products in Poland. *J. Food Prot.* 2020; 83(6): 1002-9. <https://doi.org/10.4315/JFP-19-525>
24. Kuch A., Goc A., Belkiewicz K., Filipello V., Ronkiewicz P., Gołębiowska A., et al. Molecular diversity and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolates from invasive infections in Poland (1997-2013). *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 14562. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32574-0>
25. Al-Mashhadany D.A. Occurrence and antibiogram of *Listeria monocytogenes* isolates from retail meat shops at Erbil city, Kurdistan region, Iraq. *Ital. J. Food Saf.* 2019; 8(4): 8451. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2019.8451>
26. Baquero F., F Lanza V., Duval M., Coque T.M. Ecogenetics of antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 2020; 113(3): 570-9. <https://doi.org/10.1111/mmi.14454>
27. Maung A.T., Mohammadi T.N., Nakashima S., Liu P., Masuda Y., Honjoh K.I., et al. Antimicrobial resistance profiles of *Listeria monocytogenes* isolated from chicken meat in Fukuoka, Japan. *Int. J. Food Microbiol.* 2019; 304: 49-57. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.05.016>
28. Tahoun A.B.M.B., Abou Elez R.M.M., Abdelfatah E.N., Elsohaby I., El-Gedawy A.A., Elmoslemany A.M. *Listeria monocytogenes* in raw milk, milking equipment and dairy workers: Molecular characterization and antimicrobial resistance patterns. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2017; 10: 264-70. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.07.008>
29. Caruso M., Fracalvieri R., Pasquali F., Santagada G., Latorre L.M., Difato L.M., et al. Antimicrobial susceptibility and multilocus sequence typing of *Listeria monocytogenes* isolated over 11 years from food, humans, and the environment in Italy. *Foodborne Pathog. Dis.* 2020; 17(4): 284-94. <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2723>
30. 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. *Int. J. Modern Eng. Res. Technol.* 2015; 5(3): 5-15.
31. Воронина О.Л., Кунда М.С., Рыжова Н.Н., Кутузова А.В., Аксёнова Е.И., Карпова Т.И. и др. Листерииоз: генотипирование как ключ к выявлению возможного источника заражения. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2019; 21(4): 261-73. <https://doi.org/10.36488/cmasc.2019.4.261-273>
32. 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>
33. Coban A., Pennone V., Sudagidan M., Molva C., Jordan K., Aydin A. Prevalence, virulence characterization, and genetic relatedness of *Listeria monocytogenes* isolated from chicken retail points and poultry slaughterhouses in Turkey. *Braz. J. Microbiol.* 2019; 50(4): 1063-73. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00133-y>
34. Al-Ali H.J., Al-Rodhan M.A., Al-Hilali S.A., Al-Charrakh A.H., Al-Mohana A.M., Hadi Z.J. Molecular detection of serotype groups of *Listeria monocytogenes* isolated from gallbladder of cattle and sheep in Iraq. *Vet. World*. 2018; 11(4): 431-6. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.431-6>

REFERENCES

1. 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.
2. European Food Safety Authority (EFSA). EU summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA*. 2016; 14(12): e04634. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4634>
3. Vorob'ev A.A., Bykov A.S., Boychenko M.N. *Medical Microbiology, Virology and Immunology: Textbook for Medical School [Meditsinskaya mikrobiologiya, virusologiya i immunologiya: Uchebnik dlya studentov meditsinskikh vuzov]*. Moscow: MIA; 2022. (in Russian)
4. Tartakovskiy I.S., Maleev V.V., Ermolaeva S.A. *Listeria: Role in Infectious Pathology and Laboratory Diagnostics [Listerii: rol' v infektsionnoy patologii cheloveka i laboratornaya diagnostika]*. Moscow: Meditsina dlya vsekh; 2001. (in Russian)
5. Cao X., Wang Y., Wang Y., Li H., Luo L., Wang P., et al. Prevalence and characteristics of *Listeria ivanovii* strains in wild rodents in China. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2019; 19(1): 8-15. <https://doi.org/10.1089/vbz.2018.2317>
6. Lepe J.A. Current aspects of listeriosis. *Med. Clin. (Barc.)*. 2020; 154(11): 453-8. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2020.02.001>
7. Fertikov V.I., Tikhonov A.N., Khripunov E.M., Egorova I.Yu. On the occasion of formation of bacteria of *Listeria* genus in epoch of late pleistocene: the facts and hypothesis. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya*. 2009; 44(6): 18-26. (in Russian)
8. Bakulin N.I., Baturo A.P., Blinkova L.P., Burova S.A., Voropaeva S.D., Gavristova I.A., et al. *Clinical Laboratory Analytics [Klinicheskaya laboratornaya analitika]*. Moscow: Agat-Med; 2003. (in Russian)
9. Meghdadi H., Khosravi A.D., Sheikh A.F., Alami A., Nassirabady N. Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* from environmental and clinical sources by culture and PCR-RFLP methods. *Iran J. Microbiol.* 2019; 11(1): 7-12.
10. Es'kova A.I., Buzoleva L.S., Kim A.V., Bogatyrenko E.A., Golozubova Yu.S. Biotic environmental factors, affect survival of *Listeria monocytogenes* in marine ecosystems. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2016; (5): 294. (in Russian)
11. Ibrahim S., Azab El-Liethy M., Abia A.L.K., Abdel-Gabbar M., Mahmoud Al Zanaty A., Mohamed Kamel M. Design of a bioaugmented multistage biofilter for accelerated municipal wastewater treatment and deactivation of pathogenic microorganisms. *Sci. Total Environ.* 2020; 703: 134786. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134786>
12. Shepelin A.P., Polosenko O.V., Dyatlov I.A. Listeria. Modern approach to the problem of *Listeria* isolation using nutrient media. *Spravochnik zaveduyushchego KDL*. 2018; (7): 33-48. (in Russian)
13. Polosenko O.V., Shepelin A.P., Marchikhina I.I., Sholokhova L.P. Designing nutrient media for *Listeria* isolation. *Infektsiya i immunitet*. 2016; 6(3): 92. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2016-3> (in Russian)
14. Svetoch E.A., Eruslanov B.V., Borzenkov V.N., Astashkin E.I., Khaptanova N.M., Kartsev N.N., et al. Specificity and sensitivity of the domestic latex test-system for *Listeria monocytogenes* identification. *Dal'nevostochnyy zhurnal infektsionnoy patologii*. 2019; (37): 81-2. (in Russian)
15. Magiorakos A.P., Srinivasan A., Carey R.B., Carmeli Y., Falagas M.E., Giske C.G., et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012; 18(3): 268-81. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>

16. Doumith M., Buchrieser C., Glaser P., Jacquet C., Martin P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(8): 3819–22. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.8.3819-3822.2004>
17. Moura A., Crisculo 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>
18. Maury M.M., Tsai Y.H., Charlier C., Touchon M., Chenal-Francois V., Leclercq A., et al. Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nat. Genet.* 2016; 48(3): 308–13. <https://doi.org/10.1038/ng.3501>
19. Patange A., O'Byrne C., Boehm D., Cullen P.J., Keener K., Bourke P. The effect of atmospheric cold plasma on bacterial stress responses and virulence using *Listeria monocytogenes* knockout mutants. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 2841. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02841>
20. Chen Y., Chen Y., Pouillot R., Dennis S., Xian Z., Luchansky J.B., et al. Genetic diversity and profiles of genes associated with virulence and stress resistance among isolates from the 2010–2013 interagency *Listeria monocytogenes* market basket survey. *PLoS One.* 2020; 15(4): e0231393. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231393>
21. Kaszoni-Rückerl I., Mustedanagic A., Muri-Klinger S., Brugger K., Wagner K.H., Wagner M., et al. Predominance of distinct *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* in recurrent contamination events at dairy processing facilities. *Microorganisms.* 2020; 8(2): 234. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020234>
22. Wilson A., Gray J., Chandry P.S., Fox E.M. Phenotypic and genotypic analysis of antimicrobial resistance among *Listeria monocytogenes* isolated from Australian food production chains. *Genes (Basel).* 2018; 9(2): 80. <https://doi.org/10.3390/genes9020080>
23. Maćkiw E., Stasiak M., Kowalska J., Kucharek K., Korsak D., Postupolski J. Occurrence and characteristics of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meat products in Poland. *J. Food Prot.* 2020; 83(6): 1002–9. <https://doi.org/10.4315/JFP-19-525>
24. Kuch A., Goc A., Belkiewicz K., Filipello V., Ronkiewicz P., Gołbiewska A., et al. Molecular diversity and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolates from invasive infections in Poland (1997–2013). *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 14562. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32574-0>
25. Al-Mashhadany D.A. Occurrence and antibiogram of *Listeria monocytogenes* isolates from retail meat shops at Erbil city, Kurdistan region, Iraq. *Ital. J. Food Saf.* 2019; 8(4): 8451. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2019.8451>
26. Baquero F., F Lanza V., Duval M., Coque T.M. Ecogenetics of antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 2020; 113(3): 570–9. <https://doi.org/10.1111/mmi.14454>
27. Maung A.T., Mohammadi T.N., Nakashima S., Liu P., Masuda Y., Honjoh K.I., et al. Antimicrobial resistance profiles of *Listeria monocytogenes* isolated from chicken meat in Fukuoka, Japan. *Int. J. Food Microbiol.* 2019; 304: 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.05.016>
28. Tahoun A.B.M.B., Abou Elez R.M.M., Abdelfatah E.N., Elsohaby I., El-Gedawy A.A., Elmoslemay A.M. *Listeria monocytogenes* in raw milk, milking equipment and dairy workers: Molecular characterization and antimicrobial resistance patterns. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2017; 10: 264–70. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.07.008>
29. Caruso M., Fraccalvieri R., Pasquali F., Santagada G., Latorre L.M., Difato L.M., et al. Antimicrobial susceptibility and multilocus sequence typing of *Listeria monocytogenes* isolated over 11 years from food, humans, and the environment in Italy. *Foodborne Pathog. Dis.* 2020; 17(4): 284–94. <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2723>
30. 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. *Int. J. Modern Eng. Res. Technol.* 2015; 5(3): 5–15.
31. 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/cmac.2019.4.261-273> (in Russian)
32. 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>
33. Coban A., Pennone V., Sudagidan M., Molva C., Jordan K., Aydin A. Prevalence, virulence characterization, and genetic relatedness of *Listeria monocytogenes* isolated from chicken retail points and poultry slaughterhouses in Turkey. *Braz. J. Microbiol.* 2019; 50(4): 1063–73. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00133-y>
34. Al-Ali H.J., Al-Rodhan M.A., Al-Hilali S.A., Al-Charrakh A.H., Al-Mohana A.M., Hadi Z.J. Molecular detection of serotype groups of *Listeria monocytogenes* isolated from gallbladder of cattle and sheep in Iraq. *Vet. World.* 2018; 11(4): 431–6. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.431-6>

Информация об авторах

Алексеева Елена Андреевна — к.м.н., зав. бактериологической лабораторией Центра гигиены и эпидемиологии в Вологодской области, Вологда, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1860-0026>

Полосенко Ольга Вадимовна — к.б.н., в.н.с. сектора микробиологических исследований ЛМИФХМА научно-производственного отдела питательных сред ГНЦ ПМБ, Оболensk, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5961-9041>

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

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

Борзенков Валерий Николаевич — к.б.н., с.н.с. лаб. антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ГНЦ ПМБ, Оболensk, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6382-4299>

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

Information about the authors

Elena A. Alekseeva — Cand. Sci. (Med.), Head, Bacteriological laboratory, Center of Hygiene and Epidemiology in the Vologda region, Vologda, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1860-0026>

Olga V. Polosenko — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Microbiological research department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5961-9041>

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

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

Valery N. Borzenkov — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Antimicrobial agents laboratory, Molecular microbiology department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6382-4299>

Коломбет Любовь Васильевна[✉] — д.б.н., зав. научной частью ГНЦ ПМБ, Оболensk, Россия, kolombet@obolensk.org, <https://orcid.org/0000-0001-9637-7790>

Шепелин Анатолий Прокопьевич — д.б.н., зам. директора по научно-производственной работе ГНЦ ПМБ, Оболensk, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8253-7527>

Миронов Андрей Юрьевич — д.м.н., профессор, рук. отдела микробиологии МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8544-5230>

Участие авторов. Алексеева Е.А. — концепция исследования, сбор и обработка материала, сбор литературных данных; Полосенко О.В. — обработка материала, написание текста, подготовка иллюстративного материала; Фурсова Н.К. — концепция и дизайн исследования, написание текста, редактирование; Асташкин Е.И. — обработка материала, статистическая обработка данных; Борзенков В.Н. — обработка материала; Кисличкина А.А. — сбор литературных данных и обработка материала, статистическая обработка данных; Коломбет Л.В. — редактирование; Шепелин А.П. — дизайн исследования, написание текста; Миронов А.Ю. — редактирование.

Статья поступила в редакцию 05.04.2022;
принята к публикации 05.07.2022;
опубликована 30.08.2022

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

Liubov V. Kolombet[✉] — D. Sci. (Biol.), Head, Science Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia, kolombet@obolensk.org, <https://orcid.org/0000-0001-9637-7790>

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

Andrey Yu. Mironov — D. Sci. (Med.), Professor, Head, Department of microbiology, G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8544-5230>

Author contribution. Alekseeva E.A. — developing a research concept, material collecting and processing, published data survey; Polosenko O.V. — material processing, writing the text, preparing illustrative material; Fursova N.K. — concept and design of the research, writing the text, editing; Astashkin E.I. — material processing, statistical data processing; Borzenkov V.N. — material processing; Kislichkina A.A. — literature data survey and material processing, statistical data processing; Kolombet L.V. — editing; Shepelin A.P. — research designing, writing the text; Mironov A.Yu. — editing.

The article was submitted 05.04.2022;
accepted for publication 05.07.2022;
published 30.08.2022



Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139, выделенных от больных отитами на территории Российской Федерации

Монахова Е.В.[✉], Водопьянов А.С., Кругликов В.Д., Селянская Н.А.,
Писанов Р.В., Носков А.К.

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

Аннотация

Введение. В 2017–2020 гг. в России впервые за много лет от больных отитами были выделены штаммы *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 (НАГ-вибрионов).

Цель работы — биоинформационный анализ полных геномов (WGSs) и отдельных генов штаммов НАГ-вибрионов — возбудителей отитов, выделенных в России.

Материалы и методы. Анализ WGSs 8 клинических изолятов НАГ-вибрионов, полученных на платформе «MiSeq Illumina», проводили с использованием программ «BioEdit», «BLASTN», «BLASTP», «Vector NTI»; антибиотикоустойчивость определяли согласно МУК 4.2.2495-09.

Результаты. Штаммы различались по содержанию SNP, наборам детерминант факторов патогенности/персистенции и их аллелям. Все были лишены профагов CTX, preCTX, RS1, острова патогенности VPI, гена термостабильного токсина, мобильных элементов, связанных с антибиотикорезистентностью, острова пандемичности VSP-I; 2 штамма содержали остров VSP-II. В разных сочетаниях выявлены гены ряда протеаз, cholix-токсина, кластер системы секреции 3-го типа (T3SS), дополнительные кластеры T6SS. Продукты изменённых генов сохраняли либо утрачивали характерные активные домены. В цитотоксине MARTX 6 штаммов отсутствовал ключевой домен ACD, у 4 выявлен новый домен gtxA-like. Кластеры генов биоплёнкообразования варьировали по структуре. Присутствие генов антибиотикорезистентности не всегда коррелировало с антибиотикограммами. Все штаммы были чувствительны к большинству антибиотиков, но некоторые проявляли резистентность к 1–4 препаратам.

Выводы. Все изученные штаммы — возбудители отитов, несмотря на выявленные различия, обладают достаточными наборами детерминант, ответственных за реализацию патогенетического и персистентного потенциала. В связи с несопадением генотипических и фенотипических показателей антибиотикорезистентности при выборе препаратов для этиотропной терапии НАГ-инфекций следует полагаться в основном на фенотип. Выявление на территории России больных отитами, вызванными НАГ-вибрионами, указывает на целесообразность включения тестов на их присутствие в схему бактериологического анализа при внекишечных инфекциях и в случаях их выделения — оперативного определения чувствительности к антибиотикам.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139, внекишечные формы НАГ-инфекций, полногеномные секвенсы, биоинформационный анализ, факторы патогенности/персистенции

Этическое утверждение. Все штаммы получены из Музея живых культур (коллекция Референс-центра Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора).

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

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

Для цитирования: Монахова Е.В., Водопьянов А.С., Кругликов В.Д., Селянская Н.А., Писанов Р.В., Носков А.К. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139, выделенных от больных отитами на территории Российской Федерации. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2022;99(4):465–477.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-215>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-215>

Molecular genetic characteristics of *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 strains isolated on the territory of Russian Federation from patients with otitis

Elena V. Monakhova[✉], Alexey S. Vodop'yanov, Vladimir D. Kruglikov, Nadezhda A. Selyanskaya, Ruslan V. Pisanov, Alexey K. Noskov

Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, Russia

Abstract

Introduction. In 2017–2020 for the first time in many years strains of *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 (NAGs) were isolated in Russia from patients with otitis.

Aim — bioinformatic analysis of whole genome sequences (WGSs) and sequences of individual genes of NAG strains - causative agents of otitis isolated in Russia.

Materials and methods. Analysis of WGSs of eight NAG clinical isolates obtained on the MiSeq Illumina platform was carried out using BioEdit, BLASTN, BLASTP, Vector NTI programs; antibiotic resistance was determined according to MUK 4.2.2495-09.

Results. The strains differed in SNP content, sets of determinants of pathogenicity/persistence factors and their alleles. All lacked CTX, preCTX, RS1 prophages, VPI pathogenicity island, thermostable toxin gene, mobile elements associated with antibiotic resistance, pandemicity island VSP-I; two strains contained VSP-II island. Genes of a number of proteases, cholix toxin, type 3 secretion system (T3SS) cluster and additional T6SS clusters formed different combinations. Products of the altered genes retained or lost their characteristic active domains. In the cytotoxin MARTX of 6 strains, the key ACD domain was absent; in 4 strains a new rtxA-like domain was revealed. Biofilm gene clusters varied in their structure. The presence of genes for antibiotic resistance did not always correlate with antibioticograms. All strains were susceptible to most antibiotics, but some showed resistance to 1–4 drugs.

Conclusion. All the studied strains — causative agents of otitis, in spite of revealed differences, have sufficient sets of determinants responsible for realization of pathogenic and persistent potential. Due to discrepancy between the genotypic and phenotypic characteristics of antibiotic resistance, one should rely mainly on the phenotype when choosing drugs for the etiotropic therapy of NAG infections. Emergence of patients with otitis caused by NAG-vibrios in Russia indicates the advisability of the inclusion of tests for their identification in the scheme of bacteriological analysis for extraintestinal infections and, in cases of their isolation, for prompt determination of sensitivity to antibiotics.

Keywords: *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139, extraintestinal forms of NAG infections, whole genome sequences, bioinformatics analysis, pathogenicity/persistence factors

Ethics approval. All strains were obtained from the Museum of Living Cultures (anonymized collection of the Reference Center of the Rostov-on-Don Plague Control Research Institute).

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

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

For citation: Monakhova E.V., Vodop'yanov A.S., Kruglikov V.D., Selyanskaya N.A., Pisanov R.V., Noskov A.K. Molecular genetic characteristics of *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 strains isolated on the territory of Russian Federation from patients with otitis. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(4):465–477.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-215>

Введение

Холерные вибрионы nonO1/nonO139 серогрупп (НАГ-вибрионы), естественные обитатели поверхностных водоемов, способны вызывать острые кишечные инфекции различной степени тяжести в виде спорадических случаев либо локальных вспышек [1]. Гораздо реже они являются этиологическими агентами внекишечных форм, выявляемых, как правило, у ослабленных пациентов, страдающих сопутствующими хроническими заболеваниями. Тем не менее в литературе имеется достаточно мно-

го сообщений о выделении НАГ-вибрионов из клинического материала при первичной бактериемии, поражениях кожи и мягких тканей, мочеполовой системы, желчевыводящих путей, пневмонии [2, 3]. Не последнее место в этом списке занимают отиты (острые либо хронические), проявляющиеся в виде воспаления среднего уха или наружного слухового прохода [3]. Случаи отитов, вызванных НАГ-вибрионами, регистрировались в нынешнем столетии в Германии, Австрии и Венгрии [2, 3]. В 2019 г. в Германии наблюдали случай хронического отита у

Таблица 1. Клинические штаммы *V. cholerae* nonO1/nonO139, использованные в работе
Table 1. *V. cholerae* nonO1/nonO139 clinical strains used in this study

№ No.	Штамм Strain	Место выделения Location of isolation	Год Year	Диагноз Diagnosis	Источник выделения Source of isolation
1	20377	Челябинск Chelyabinsk	2017	Хронический отит Chronic otitis	Мазок из уха Ear swab
2	20284	Челябинск (завоз из Туниса) Chelyabinsk (importation from Tunisia)	2017	Острый отит Acute otitis	- " -
3	41	Москва Moscow	2018	Отит Otitis	- " -
4	173	Москва Moscow	2019	Отит Otitis	- " -
5	1175	Москва Moscow	2019	Отит Otitis	- " -
6	14980	Москва (завоз из Дагестана) Moscow (importation from Dagestan)	2019	Отит Otitis	- " -
7	735	Челябинск Chelyabinsk	2020	Гнойный отит Purulent otitis	Выделения из уха Ear discharge
8	118	Челябинск Chelyabinsk	2020	Не указан Not indicated	Кровь Blood

ребёнка, заразившегося при купании в Балтийском море. В Израиле зарегистрировано развитие хронического отита у воднолыжника, заразившегося в 2011 г. в Австралии в результате перфорации барабанной перепонки при аварии и попадании речной воды в среднее ухо; этиологическим агентом оказался штамм O100 серогруппы [4]. Во Франции в 2017 г. НАГ-вибрион был выделен из отделяемого уха ребёнка, больного хроническим рецидивирующим мокнущим отитом; незадолго до обострения он купался в реке на территории страны [5]. В том же году в Испании НАГ-вибрион был выделен от больного с диагнозом «острый наружный отит»; заболевание проявилось после купания в Средиземном море [6]. Аналогичные случаи заражения при купании в водоёмах отмечены также в Швеции, Финляндии, Бельгии, Великобритании, Испании, Румынии, на Маврикии [3].

Авторы отмечают, что заражение людей происходит преимущественно в тёплое время года, что создаёт благоприятные условия как для купания, так и для размножения НАГ-вибрионов [5, 6]; высказывалось даже предположение о том, что продолжающиеся изменения климата могут в скором времени привести к повышению заболеваемости людей за счёт инфицирования НАГ-вибрионами и другими представителями вибриофлоры в мировом масштабе [7].

НАГ-вибрионы крайне вариабельны по генотипическим свойствам за счёт высокой пластичности их геномов. В имеющихся публикациях генетические характеристики возбудителей внекишечных форм заболеваний ограничены ПЦР-детекцией отдельных генов, реже — данными частичного секвенирования их участков. В базах National Center for Biotechnology Information (NCBI) были найдены

только полногеномные сиквенсы (WGSs) штаммов-возбудителей наружных отитов, выделенных в Австрии. Эти сиквенсы частично проанализированы S. Lepuschitz и соавт. в плане обнаружения генов антибиотикорезистентности [8].

Наш интерес к НАГ-вибрионам, вызвавшим отиты, обусловлен тем, что в 2017–2020 гг. такие штаммы выделялись из отделяемого уха больных на территории России.

Целью настоящей работы явился биоинформационный анализ полных геномов штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139, выделенных от больных отитом на территории России, а также отдельных генов и продуктов их трансляции *in silico*.

Материалы и методы

Объектами исследования служили 7 штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139, выделенные от людей на территории России в 2017–2020 гг. Для сравнения в анализ был включен ещё 1 штамм, выделенный из крови больного с неизвестным диагнозом (**табл. 1**). Все штаммы получены из Музея живых культур (коллекция Референс-центра Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора).

Полногеномное секвенирование (WGS) осуществляли на платформе MiSeq [9]. Сравнительный однонуклеотидный (SNP) анализ проводили согласно предложенной ранее схеме [10].

Отдельные гены и их кластеры идентифицировали в полных геномах с помощью программ «BLASTN v. 2.2.29»¹ и «BioEdit v. 7.2.5»². Трансляцию генов, сравнительный анализ их нуклеотидных последовательностей и аминокислотных (aa) про-

¹ URL: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>

² URL: <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit>

Таблица 2. Сиквенсы, использованные в сравнительном анализе в качестве прототипов**Table 2.** Reference sequences used as prototypes in comparative analysis

NCBI ID	Штаммы Strains	Сиквенсы Sequences
AE003852, AE003853	<i>V. cholerae</i> O1 N16061	2 хромосомы 2 chromosomes
AATY020000000	<i>V. cholerae</i> O37 AM-19226	WGS
AATY020000003, AATY020000004	- " -	T3SS cluster
AY876053, AB754471, AB754432	<i>V. cholerae</i> nonO1/nonO139 TP, C30, VC034	chxA-I, II, III
M85198	<i>V. cholerae</i> O31 NRT-36	stn
L03220	<i>V. cholerae</i> O1 GP156	sto

дуктов осуществляли с использованием пакета программ «Vector NTI Advance 11» («Invitrogen»). Прототипами служили соответствующие последовательности референс-штамма *V. cholerae* N16061 и другие, отсутствующие в его геноме (табл. 2). Для определения наличия и локализации активных доменов в белках, а также выявления их гомологов у штаммов из других регионов мира выполняли BLASTP-анализ.

Поиск в WGSs генетических детерминант лекарственной устойчивости проводили с использованием базы CARD³, а также нуклеотидных последовательностей отдельных генов, встречающихся у холерных вибрионов и отобранных в соответствии с набором включенных в исследование антибиотиков (табл. 3). Фенотипически чувствительность/устойчивость штаммов к антибактериальным препаратам определяли согласно МУК 4.2.2495-09⁴.

WGSs штаммов, полученные нами в рамках настоящего исследования, депонированы в NCBI GenBank (BioProject: PRJNA781803, BioSample ID SAMN23296539-23296546).

Результаты

С помощью SNP-анализа WGSs 8 штаммов НАГ-вибрионов была построена дендрограмма, отражающая их сходство и различия (рис. 1).

Как видно из рис. 1, все штаммы различались между собой по содержанию SNP, хотя некоторые обладали более выраженным сходством друг с другом и образовали несколько кластеров, что указывает на отсутствие общих источников инфицирования даже в случаях одного места и времени выделения.

Далее были проведены идентификация в WGSs детерминант факторов патогенности/персистенции и их сравнительный биоинформационный анализ.

BLAST-анализ показал, что все исследованные штаммы были лишены профагов CTX, preCTX и

RS1, острова патогенности VPI, гена термостабильного токсина *stn/sto*, а также острова пандемичности VSP-I. Однако остров VSP-II был выявлен у двух штаммов (173 и 1175).

Вместе с тем штаммы могли существенно различаться как по наборам генетических детерминант, так и по их аллельному составу. Так, всего у 2 штаммов, выделенных в Москве в 2019 г., присутствовали гены cholix-токсина (ChxA): у 173 — *chxAI*, у 1175 — *chxAII*.

Интактный кластер RTX, ответственный за синтез цитотоксина-актиномоделлятора MARTX, присутствовал у всех штаммов, однако ген собственно токсина *rtxA* отличался значительной вариабельностью по длине и числу молчащих и миссенс-мутаций, что отразилось на aa-составе продуктов разных аллелей. Как видно из рис. 2, только у 2 штаммов белки MARTX оказались наиболее близкими прототипному RtxA1 и содержали все характерные для него активные домены: актин-связывающий (ACD), инактивирующий Rho-ГТФазу (RID), цистеиновой протеазы (CPD) и α - β -гидролаз (α/β H), два других отличались от них не только длиной, но и отсутствием ACD. Белки оставшихся 4 штаммов,



Рис. 1. Дендрограмма, построенная на основе кластерного анализа (UPGMA) распределения 3683 SNP, расположенных в открытых рамках считывания. В исследование включали только те SNP, для которых в пределах 9 п.н. от исследуемого полиморфизма не зафиксировано других мутаций.

Fig. 1. Phylogenetic tree based on cluster analysis (UPGMA) of distribution of 3683 SNPs located in open reading frames. Only SNPs that were not associated with other mutations within flanking 9 nucleotides were included in analysis.

³ Comprehensive Antibiotic Resistance Database. URL: <https://card.mcmaster.ca>

⁴ Методические указания 4.2.2495-09. Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сап, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам. М., 2009. 59 с.

Таблица 3. Гены, использованные для идентификации детерминант антибиотикорезистентности в WGSs НАГ-вибрионов

Table 3. Genes used for identification of antibiotic resistance determinants in WGSs of NAGs

Гены Genes	Устойчивость к антибиотикам Resistance to antibiotics	ID сиквенсов, включающих искомые гены ID of sequences containing the necessary genes
<i>tetA, tetR</i>	Тетрациклины Tetracyclines	AB114188 (SXT)
<i>floR</i>	Хлорамфеникол Chloramphenicol	AB114188, AY034138 (SXT)
<i>catB9</i>	- « -	NG_047621, AF462019
<i>blaP1</i>	Ампициллин Ampicillin	AB219457, AB219455, AY605693, AF221899
<i>carb7, carb9</i>	- « -	AF409092, AY248038
<i>blaNDM-1</i>	Бета-лактамы (карбапенемы и др.) Beta-lactams (carbapenems <i>et al.</i>)	LN831184*, LN831185*
<i>blaCTX-M</i>	Цефалоспорины (цефтриаксон) Cephalosporins (ceftriaxone)	MT151380
<i>qnrVC1</i>	Фторхинолоны (налидиксовая кислота, ципрофлоксацин) Fluoroquinolones (nalidixic acid, ciprofloxacin)	EU436855, HM015626
<i>aadA1</i>	Аминогликозиды (стрептомицин) Aminoglycosides (streptomycin)	Y115577, AY103457
<i>strA, strB</i>	- « -	AB114188
<i>aphA1</i>	Канамицин Kanamycin	XXU13633, AY090559
<i>aadA2, aadB</i>	Гентамицин Gentamicin	AY103460, EU436855
<i>arr3, arr-2</i>	Рифампицин Rifampicin	HM015626, EU116441
<i>nfsA</i>	Нитрофураны (фуразолидон) Nitrofurans (furazolidone)	AE004158
<i>dfrA18</i>	Триметоприм Trimethoprim	AY034138
<i>dfrA1, A12, A5</i>	- « -	AY103456, AF455254, AY103459, AF512546
<i>dfrA23</i>	- « -	MT151380*
<i>sul2, sul1</i>	Сульфаметоксазол Sulfamethoxazole	AB114188, AY034138; MT151380*
Гены компонентов эффлюкс-помп: Genes for components of efflux pumps:		
<i>VC1634 N16961</i>	Бицикломицин/сульфонамиды и др. Bicyclomycin/sulfonamides <i>et al.</i>	AE004241
<i>VcmA, B, D, H, N, VcrM</i>	Множественная Multiple	AE004232, AB213656-213659, AB073219

Примечание. *Плазмиды.
Note. *Plasmids.

лишенные не только ACD, но и α/β H, содержали по 2 RID. Кроме того, у них появился новый домен, описанный программой «BLASTP» как «gtxA-подобный». На дендрограмме они образовали отдельный кластер.

Ген гемолизина *hlyA* был интактным у всех 8 штаммов, хотя и представлен разными отличными от прототипа аллелями за счёт молчащих и миссенс-мутаций. Такая же картина наблюдалась и при анализе входящего в состав *hly*-локуса гена ме-

таллопротеазы *prtV*. Оба гена имели «нормальную» (идентичную прототипу длину (соответственно 2226 и 2757 п.н.). Во всех геномах также присутствовали интактные гены других металлопротеаз — гемагглютинин/протеазы *HarA* и коллагеназы *VchC*.

Кроме генов металлопротеаз, были идентифицированы гены сериновых протеаз *vesA, vesC, ivaP, rssP*, тогда как *vesB* найден только у 4 штаммов (1175, 118, 20284 и 41), у остальных он отсутство-

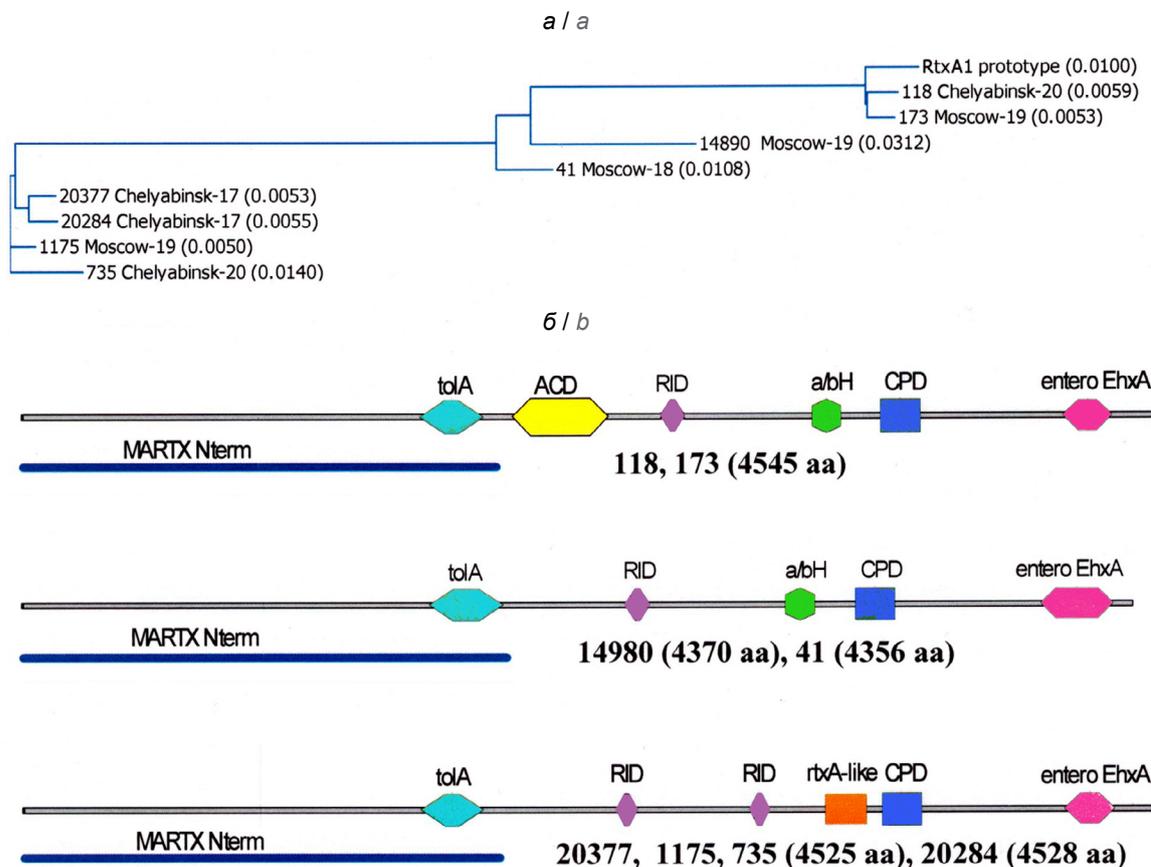


Рис. 2. Дендрограмма, построенная по результатам AlignX-анализа MARTX HAГ-вибрионов (а) и топография доменов в их молекулах (б).

Fig. 2. Phylogenetic tree based on the results of AlignX analysis of MARTX of NAG vibrios (a) and topography of domains in their molecules (b).

вал. Все исследуемые штаммы содержали разные аллели гена *vesC*, у четырех (173, 14980, 20377, 735) довольно близкие прототипу, у остальных они имели ряд делеций, кратных 3 нуклеотидам, в результате чего их продукты укоротились с 548 аа до 545 аа у штамма 118, 538 аа — у 1175 и 20284 аа, 534 аа — у 41, однако преждевременных стоп-кодонов не образовалось. Кроме того, у всех сохранились характерные активные домены и каталитическая триада Asp122, His75, Ser225 (у 3 последних — Ser219 за счёт предшествующей делеции 6 аа, однако остаток серина находился в короткой последовательности GDSGGPIFF, идентичной у всех штаммов). Также в типовых позициях находились S63, G159, Y277, Q279 (Q273), замещение которых на другие аа может приводить к блокировке активности белка [11].

Гены *IvaP* также различались по длине и нуклеотидному составу, однако их продукты имели те же домены, что у прототипа. В базах NCBI найдены их гомологи, принадлежащие штаммам из разных регионов мира (EGR2467683, KAA1203788, MBJ6933743, EGQ7641687 и др.). Гены рибосортоазы *rssP* также были представлены разными аллелями, из которых только один (штамма 735) был

близок прототипу (со старт-кодоном TTG), тогда как 7 остальных были укорочены до 60 п.н. из-за SNP *G58T* и образования преждевременного стоп-кодона. Однако ниже этой открытой рамки считывания (ORF) образовалась вторая, со старт-кодоном GTG. Продукты этих ORF2 (183–185 аа), различаясь между собой по аа-составу, тем не менее имели все 4 характерных активных домена. Такие формы RssP широко представлены в NCBI и обозначены как рибосортоазы *V. cholerae*.

Значительным разнообразием отличались и гены *cef* (CHO cell elongating factor). Продукты всех 8 аллелей этого гена, несмотря на существенные различия, сохранили все характерные активные домены — Куница, лейциновую молнию, α/β H и LIP, а также субстрат-связывающий сайт GHSLG.

Что касается таких факторов, как контакт-зависимые системы секреции — 6-го и 3-го типов (T6SS и T3SS), то гены первой, входящие в состав основного кластера (*vipAB*, *hiF*, *vasABCDEFG*, *clpV*, *vasHIJKLM*), присутствовали в WGSs всех 8 штаммов, тогда как гены эффектора *vgrG3* отличались вариативностью, и только у 2 штаммов (14980 и 735) сохранили полную последовательность, кодирующую

шую концевой пептидогликан-связывающий домен PBD, у остальных были значительно укорочены. Также не у всех выявлены гены дополнительных кластеров T6SS [12]. Auh-1 отсутствовал у штаммов 118 и 173, у остальных обнаружен ген эффектора *vgrG1* с последовательностью, кодирующей актин-связывающий домен ACD, но все были лишены *tseL*. Auh-2 не был найден у штаммов 20377 и 41, у остальных содержал гены эффекторов *vasW* и *vasX*. Auh-3 отсутствовал во всех WGS, а последовательности, гомологичные таковым Auh-4 [12], имелись у штаммов 1175, 41 и 735.

У одного из штаммов (118) присутствовал кластер T3SS, включая коровую область (гены регуляторов транскрипции *vttR-A, B*; структурных компонентов *vcsN2, C2, T2, R2, Q2, U2, V2, J2, vspD*; транслоконов *vorH, A, M, I, W, F* и 2 переменных фланкирующих участка: 3' (ген предполагаемого фактора вирулентности *acfA*, транслоконов *vorE, X*) и 5' (ген предполагаемых факторов вирулентности *acfC, D* и транслоконов *vorG, K, Y, Z*). Кроме того, в состав всех трех участков входили гены, функции которых пока не установлены. У штамма 118 структура кластера T3SS в целом совпадала с таковой референс-штамма AM-19226, особенно коровой области, за исключением присутствия в ней дополнительной ORF длиной 1368 п.н., кодирующей белок-шаперон, после *vorW*. Почти все гены имели ту же длину, что у прототипа, но отличались значительным количеством SNP, ни один из которых не вызвал появления преждевременного стоп-кодона.

При анализе кластеров генов, обуславливающих продукцию маннозо-чувствительных пилей адгезии, установлено, что все изученные штаммы содержали изменённые гены структурных единиц пилей, ранее обозначенные нами как *mshA-like* и *mshC-like* [13]. Их продукты различались по аа-составу и на дендрограммах имели разную степень сходства друг с другом (данные не показаны), однако все сохраняли активные домены адгезинов. Белки MshA-like могли различаться и по длине (148–162 аа), тогда как MshC-like все содержали по 170 аа. Ни один не имел близкого родства с прототипными белками MshA (178 аа) и MshC (162 аа).

Кроме *msh*-кластера, у всех штаммов также присутствовали кластеры генов, ответственных за образование полисахаридов *vpsI* (*vpsUABCDEFGHIJK*), *vpsII* (*vpsLMNOPQ*) и матрикса биоплёнки *rbm* (*rbmABCDEF*), расположенного между ними. Все перечисленные гены у исследуемых штаммов в разной степени отличались как от прототипа, так и друг от друга по нуклеотидному составу, а некоторые и по длине, однако ни у одного не образовалось преждевременного стоп-кодона. Интактными оказались и гены регуляторов их экспрессии, локализованные в других участках генома — положительных (*VpsR, VpsT*) и отрицательных (*CytR, NapR* и *H-NS*). Наи-

более гетерогенным оказался кластер *vpsI*: только у 5 штаммов (1175, 14980, 20284, 20377 и 735) его структура полностью совпадала с прототипом, хотя в самих генах обнаруживались различные SNP. Напротив, у остальных выявлены отклонения, состоящие в отсутствии генов *vpsC, vpsG* и появлении новых ORF, не идентифицированных программой «BioEdit». Так, у штаммов 173 и 41 при отсутствии идентифицируемых *vpsF* и *vpsG* на их месте находились 2 ORF. Согласно данным программы «BLASTP», продукт первой имел 99–100% идентичности ряду гипотетических белков холерных вибрионов (EGR4217822, EGQ7706406, EGQ7879351 и др.), однако самой программой был обозначен как белок синтеза полисахаридов семейства VpsF (WP_000660859). Продукт второй ORF также имел 99–100% гомологи в базе NCBI среди гликозилтрансфераз *V. cholerae* (WP_113629015, EEO14829, EGQ9982865, EGR2039702, EGR2114868 и др.). У штамма 118 перед геном, сходным с *vpsI*, находились 3 дополнительных ORF, имеющих гомологи в NCBI; продукт одной из них (ORF2) был гомологичен большей части молекул белков, обозначенных как рибозилтрансферазы (WP_108243855, EGQ7689606 и др.) и содержал соответствующие активные домены, тогда как продукты ORF1 и ORF3 одинаковой длины (374 аа), но с совершенно различным аа-составом, тем не менее содержали одинаковые потенциальные домены. Один из которых имеет отношение к синтезу полисахаридов, функция второго неизвестна, хотя он сходен с RimK α-глутаматлигаз.

Самой выраженной вариабельностью обладал ген *vpsU*. У всех исследуемых НАГ-вибрионов эти гены различались по нуклеотидному составу, у некоторых также по длине и старт-кодонам, а у штамма 118 он даже не был идентифицирован программой «BioEdit», однако в дальнейшем в его продукте программой «BLASTP» были выявлены те же домены низкомолекулярных тирозинфосфатаз, что и у *VpsU*.

Кластеры *vpsII* и *rbm* были более или менее близки прототипам (не считая SNP в генах), за исключением «неопознанного» гена *rbmA* штамма 20284, продукт которого был гомологичен гипотетическим белкам *V. cholerae* (WP_142569116, TQP27817, TQQ39191 и др.) и *RbmA V. albensis* (EEO04139).

Генов, гомологичных детерминантам антибиотикорезистентности (табл. 3), не выявлено почти у всех исследованных штаммов НАГ-вибрионов (табл. 4). Исключением явилось обнаружение гена *blaP1* у штамма 735 и *catB9* у него же и штаммов 118 и 14980. В то же время у всех выявлен ген *nsfA*, хотя его связь с устойчивостью к фуразолидону описана для ряда бактерий, но не для холерных вибрионов. Что касается детерминант эффлюкс-помп, участвующих в обеспечении

Таблица 4. Минимальная подавляющая концентрация (мг/л) штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 и наличие генов антибиотикорезистентности**Table 4.** Minimal inhibitory concentrations (mg/l) for *V. cholerae* nonO1/nonO139 strains and presence of genes associated with antibiotic resistance

№ No.	Штамм Strain	Антибактериальные препараты / Antimicrobial agents												
		TET	DOX	CMP	AMP	CFT	NAL	CIP	STR	KAN	GEN	RIF	FUR	SXT
1	41	0,25	0,25	2	32 ^R	4 ^R	2	0,001	8	8	0,25	2	32 ^R	4
2	173	0,25	0,25	2	4	0,5	2	0,001	8	8	0,25	2	64 ^R	0,5
3	1175	0,25	0,25	2	16 ^R	0,5	2	0,001	8	4	0,25	4	32 ^R	16 ^R
4	20377	0,25	0,25	1	4	0,5	2	0,001	8	8	0,25	2	32 ^R	0,5
5	20284	0,25	0,25	1	8 ^I	0,5	16 ^R	0,001	8	4	0,25	2	32 ^R	0,5
6	14980	0,25	0,25	1	8 ^I	0,5	2	0,001	8	8	0,25	8 ^I	32 ^R	8 ^R
7	118	0,25	0,25	2	4	0,5	2	0,001	8	4	0,25	2	32 ^R	4
8	735	1	0,25	2	128 ^R	1	2	0,001	8	8	0,25	32 ^R	32 ^R	4

№ No.	Штамм Strain	Гены / Genes												
		tetA,R	unknown	catB9	blaP1, carb7,9	blaCTX-M	qnrVC1	strA,B, aadA1	aphA1	aadA2	arr2,3	nsfA	dfrA/sul2	
1	41	–		–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–/–
2	173	–		–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–/–
3	1175	–		–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–/–
4	20377	–		–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–/–
5	20284	–		–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–/–
6	14980	–		+	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–/–
7	118	–		+	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–/–
8	735	–		+	+	–	–	–	–	–	–	–	+	–/–

Примечание. TET — тетрациклин, DOX — доксициклин, CMP — хлорамфеникол, AMP — ампициллин, CFT — цефтриаксон, NAL — налидиксовая кислота, CIP — ципрофлоксацин, STR — стрептомицин, KAN — канамицин, GEN — гентамицин, RIF — рифампицин, FUR — фуразолидон, SXT — триметоприм/сульфаметоксазол.

У всех штаммов также выявлены гены эффлюкс-помп VC1634, *vcmABDHN*, *vcrM* и не выявлены SXT, интегроны 1 класса и плазмиды. ^R — устойчивость, ^I — промежуточная устойчивость; остальные значения соответствуют чувствительности в соответствии с МУК 4.2.2495-09.

Note. TET — tetracycline, DOX — doxycycline, CMP — chloramphenicol, AMP — ampicillin, CFT — ceftriaxone, NAL — nalidixic acid, CIP — ciprofloxacin, STR — streptomycin, KAN — kanamycin, GEN — gentamicin, RIF — rifampicin, SXT — trimethoprim/sulfamethoxazole. All strains also shared efflux pump genes VC1634, *vcmABDHN*, *vcrM*, and lacked SXT elements, class 1 integrons and plasmids.

^R — resistance, ^I — intermediate resistance; the rest values correspond to sensitivity, in accordance with MUK 4.2.2495-09.

множественной лекарственной устойчивости, то они присутствовали у всех штаммов. Не удалось выявить мобильных элементов (SXT, интегронов класса 1, плазмид) и связанных с ними интеграз. Фенотипически все исследованные штаммы были устойчивы к фуразолидону и чувствительны к большинству антибиотиков. Вместе с тем некоторые проявляли резистентность к отдельным препаратам — от 1 до 4 (табл. 4).

Обсуждение

SNP-анализ показал, что исследованные штаммы НАГ-вибрионов, выделенные от разных больных, в большей или меньшей степени различались. Эти данные подтвердили отсутствие общих источников инфицирования даже в случаях одного места и времени выделения, что не удивительно, поскольку внекишечные формы заболеваний возникают,

как правило, спорадически и не связаны с локальными вспышками.

Наибольший интерес представлял сравнительный анализ структуры генов факторов патогенности, которые могли внести свой вклад в развитие заболеваний, а также факторов персистенции, обеспечивающих выживание в водоёмах, обычно служащих источниками инфекции при отитах. При этом многие биологически активные субстанции вибрионов совмещают в себе свойства тех и других, т.е. являются по сути факторами патогенности/персистенции.

Гены одного из таких факторов — cholix-токсина — были выявлены у 2 из 8 штаммов, причём в виде разных аллелей: *chxAI* и *chxAII*. Продукты этих генов (в отличие от третьей известной формы ChxAIII) считаются причастным к развитию в основном внекишечных форм заболеваний, тогда как

их роль в патогенезе острых кишечных инфекций остаётся спорной [14]; в то же время все 3 формы могут способствовать персистенции возбудителей в ассоциации с водными ракообразными [15].

Одним из существенных факторов патогенности холерных вибрионов считается высокомолекулярный цитотоксин-актиномоделлятор MARTX, чья биологическая активность обусловлена присутствием в молекуле нескольких активных доменов: ACD, RID, CPD, α/β H. У нетоксигенных штаммов, в особенности у НАГ-вибрионов, кодирующий его ген *rtxA* может быть представлен множеством аллелей. Среди их продуктов зачастую встречаются белки, утратившие один или более доменов, иногда взамен приобретая новые [16]. Наиболее близкими к прототипному MARTX оказались продукты генов двух разных по происхождению штаммов, два других отличались от них не только длиной, но и отсутствием ACD. Белки оставшихся 4 штаммов, лишённые не только ACD, но и α/β H, содержали по 2 RID. Наибольший интерес представляет обнаружение у них *rtxA*-подобного домена (*cd14729*⁵), который не выявлялся в MARTX возбудителей кишечных инфекций, изученных нами ранее [16]. Этот домен ещё недостаточно охарактеризован, однако, согласно аннотации программы «BLASTP», встречается у ряда белков, включая MARTX этиологического агента наиболее опасных раневых инфекций *V. vulnificus* и дермонекротический токсин *Pasteurella multocida* — возбудителя пастереллеза, который у людей также может протекать в форме раневой инфекции. Поэтому не исключено, что данный изменённый фактор мог приобрести свойства других токсинов, способных участвовать в патогенезе.

В качестве мощного фактора патогенности может выступать гемолизин/цитотоксин HlyA, особенно у нетоксигенных штаммов разных серогрупп [1]. В нашем случае кодирующий его ген был интактным у всех 8 штаммов, хотя и представлен разными отличными от прототипа аллелями за счёт молчащих и миссенс-мутаций. Такая же картина наблюдалась при анализе входящего в состав *hly*-локуса гена металлопротеазы PrtV, обладающей цитотоксической активностью за счёт деградации фибриногена, фибронектина и плазминогена, а также оказывающей летальное действие на водных беспозвоночных, питающихся бактериями [17]. Гены других металлопротеаз — гемагглютинин/протеазы HA/P и коллагеназы VchC — также были интактными. Первая может выступать в роли токсина-актиномоделлятора и обеспечивать конкурентоспособность вибрионов в разных экологических нишах, благодаря широкому спектру протеолитической активности, вторая, предположительно, способствует развитию

раневых инфекций и утилизации коллагена гидробионтов в качестве источника питания [18].

Гены сериновых протеаз *vesA*, *vesC*, *ivaP*, *rssP* выявлены у всех штаммов, а *vesB* — только у 4, у остальных он отсутствовал. VesC способствует развитию воспалительной диареи [19], причастность к внекишечным формам заболевания и конкурентоспособности вибрионов нигде не описана, хотя можно предположить, что протеолитическая активность позволяет утилизировать белковые субстраты. VesA и VesB наряду с HA/P могут активировать А-субъединицу холерного токсина, что не актуально для нетоксигенных штаммов, но вносят (особенно вторая) значительный вклад в протеолитическую активность холерных вибрионов [20]. Поскольку холерные вибрионы обладают множеством протеаз, отсутствие гена *vesB* у 4 исследуемых штаммов вполне может компенсироваться экспрессией других генов. IvaP — сериновая протеаза семейства S8 — участвует в деградации фактора иммунной защиты макроорганизма интеллектина, а также в переходе планктонных бактериальных клеток в биоплёнку и обратно [20]. Ромбосортаза (RssP) осуществляет посттранскрипционную модификацию Ves-протеаз, однако экспериментальные данные были получены с использованием прототипной RssP [21], тогда как активность ее изменённых форм неизвестна.

Значительным разнообразием отличались и гены *cef*, кодирующий цитотонический токсин, одновременно обладающий свойствами липазы/эстеразы, ответственной за усвоение липидных субстратов и способной к разрушению поверхностно-активных веществ, в настоящее время часто загрязняющих поверхностные водоёмы. Продукты всех 8 аллелей генов *cef*, несмотря на существенные различия, сохранили все характерные активные домены. Причастность Cef к патогенезу внекишечных форм заболеваний не известна, однако его способность повреждать ультраструктуру культивируемых клеток [22] не исключает такой возможности.

Важным фактором патогенности/персистенции холерных вибрионов является T6SS: в организме хозяина вызывает обездвиживание и гибель макрофагов, способствует колонизации кишечника [23], в объектах окружающей среды защищает вибрионы от поедания одноклеточными хищниками, питающимися бактериями, и участвует в колонизации хитина водных беспозвоночных, а в обоих нишах — убивает бактерий-конкурентов, продукты лизиса которых могут служить источниками питания [24]. Отсутствие у некоторых исследованных штаммов отдельных детерминант T6SS вызывает сомнения по поводу возможности её экспрессии, в особенности у штаммов 118, 173, 20377 и 41, поскольку у двух первых отсутствовал ген ключевого эффектора *vgrG1*, у двух вторых — *vasX*. Кроме того, у всех

⁵ По базе данных CDD — Conserved Domains Database.
URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd>

8 штаммов отсутствовал ген *tseL*. Вместе с тем известно, что *VgrG1*, *VasX* и *TseL* необходимы для проявления устойчивости к поеданию простейшими, а последний и *VgrG3* обеспечивают антагонистическую активность по отношению к бактериям, причём степень утраты данных свойств зависит от числа отсутствующих либо повреждённых генов [25], поэтому для определения соответствующих фенотипов исследуемых штаммов требуются дополнительные экспериментальные исследования.

Наличие интактного кластера T3SS у одного из штаммов предполагает возможность экспрессии данной системы секреции. Известно, что она способствует колонизации кишечника и развитию тяжёлой летальной диареи у лабораторных животных [26]. Высказывалось предположение о её возможном вкладе в выживаемость вибрионов в объектах окружающей среды в ассоциации с водными организмами [27].

Одной из составляющих успешного переживания в водоёмах является способность вибрионов к биоплёнокообразованию. Кодированные *msh*-кластером пили MSHA обеспечивают адгезию бактериальных клеток к абиотическим и биотическим поверхностям, предшествующую формированию биопленки, а её дальнейшее созревание зависит от экспрессии генов, организованных в 3 сцепленных кластера: *vpsI-rbm-vps-II*. Несмотря на существенные различия в структуре этих кластеров, мы полагаем, что все они находятся в функционально активном состоянии. Ранее нами были выявлены штаммы *V. cholerae* O1 серогруппы, обладающие сходной структурой генов *mshA-like*, *mshC-like*, *vps*, *rbm* и при этом в экспериментах *in vitro* образовывавшие зрелые биоплёнки на стекле с гораздо большей скоростью по сравнению со штаммами, содержащими прототипные либо близкие им кластеры [9]. Не исключено, что именно эти изменения лежат в основе селективных преимуществ и НАГ-вибрионов. MSHA обычно связывают с персистенцией холерных вибрионов в водоёмах за счёт формирования биоплёнок на абиотических и биотических поверхностях и противостояния поеданию водными беспозвоночными, тогда как их роль в колонизации кишечника человека считается незначительной. Однако MSHA-подобные пили не чувствительны к маннозе, и в условиях эксперимента штаммы НАГ-вибрионов — возбудители острых кишечных инфекций с таким же генотипом — обладали адгезивной активностью [13]. Это позволяет предположить, что в отсутствие пилей TCP и других адгезинов они могут брать на себя роль ключевого фактора колонизации.

Для успешного лечения НАГ-инфекций крайне важны данные о спектрах резистентности штаммов-возбудителей. В литературе описан случай полного излечения больного, страдавшего от хро-

нического отита в течение 3 лет, после непродолжительного применения ушных капель с правильно подобранным антибиотиком (ципрофлоксацином) [4]. Известны и другие случаи успешного лечения отитов препаратами, подобранными на основе антибиотикограмм [3, 5, 6]. В литературе встречаются сообщения о штаммах НАГ-вибрионов, устойчивых к одному и более антибактериальным препаратам и содержащих соответствующие генетические детерминанты в составе интегронов либо плазмид [28, 29]. Изученные нами штаммы не содержали мобильных элементов SXT, интегронов 1 класса, плазмид и, соответственно, связанных с ними детерминант антибиотикорезистентности. В большинстве случаев их отсутствие коррелировало с чувствительностью к антибиотикам. Однако иногда наблюдалось несоответствие результатов изучения фенотипа и генотипа. Например, 5 из 8 штаммов были в различной степени устойчивы к ампициллину, и только у одного из них, самого устойчивого, были выявлены гомологи генов бета-лактамаз *blaP1*, *bla-carb7*, *bla-carb9*, хотя все они обнаруживались в одной позиции, что указывает на присутствие одного гена в виде аллеля, характерного для этого штамма.

Что касается устойчивости всех изученных нами штаммов к фуразолидону, то не исключается, что она обусловлена продуктом гена *nfsA*, хотя сведения о связи между его экспрессией и реальной устойчивостью холерных вибрионов к нитрофуранам в литературе отсутствуют.

По одному штамму были устойчивы к цефтриаксону и налидиксовой кислоте, по 2 — к рифампицину и триметоприм/сульфаметоксазолу при полном отсутствии соответствующих генов. И наоборот, все 3 штамма, содержащие *catB9*, были чувствительны к хлорамфениколу. Аналогичные несоответствия были выявлены S. Lepuschitz и соавт. при изучении штаммов НАГ-вибрионов, выделенных из природного водоёма [8], несмотря на использование ими не только базы данных CARD, но и ResFinder⁶. Авторы считают, что на сегодняшний день эти базы являются недостаточно надёжными для оценки устойчивости НАГ-вибрионов и нуждаются в существенном пополнении.

С другой стороны, экспрессия генов не является единственным способом защиты от антимикробных агентов. Практически все холерные вибрионы, в том числе изученные нами штаммы, имеют эффлюкс-помпы, препятствующие проникновению антибиотиков в бактериальную клетку [30]. Кроме того, устойчивость зависит от внешних факторов и сложных регуляторных механизмов, требующих отдельного изучения.

В связи с вышеизложенным на данном этапе при выборе адекватного препарата для этиотропной

⁶ URL: <http://www.genomicepidemiology.org>

терапии НАГ-инфекций следует полагаться в основном на фенотип.

Заключение

Проведённый анализ показал, что все изученные штаммы-возбудители отитов обладают достаточными наборами детерминант факторов патогенности для успешной реализации патогенетического потенциала, что, впрочем, характерно и для большинства НАГ-вибрионов, причастных к развитию других форм заболеваний (как внекишечных, так и кишечных). Эти наборы могут варьировать от штамма к штамму, но отсутствие одних генов может компенсироваться наличием других, что определяет способность вызывать различные патологические процессы в организме человека. Кроме того, НАГ-вибрионы как естественные обитатели поверхностных водоёмов хорошо приспособлены к длительному существованию в объектах окружающей среды за счёт целого ряда факторов персистенции, причём эти функции часто присущи факторам патогенности, поэтому мы называем их факторами патогенности/персистенции. Продукция таких факторов находится под контролем ряда регуляторных белков, запускающих либо блокирующих экспрессию в зависимости от пребывания в той или иной экологической нише [1].

Несмотря на то что внекишечные формы НАГ-инфекций носят спорадический характер и не передаются от человека к человеку, выявление в последние годы штаммов-возбудителей на территории России вызывает настороженность и указывает на необходимость повышения внимания к данной группе микроорганизмов. В связи с этим представляется целесообразным включение тестов на присутствие НАГ-вибрионов в схему бактериологического анализа при отитах и других внекишечных инфекциях, этиологическим фактором которых могут быть эти микроорганизмы. В случаях их выделения требуется оперативное определение чувствительности к антибиотикам, что позволит обеспечить применение оптимальной схемы лечения больных или осуществить её своевременную коррекцию.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Монахова Е.В., Архангельская И.В. Холерные вибрионы неO1/неO139 серогрупп в этиологии острых кишечных инфекций: современная ситуация в России и в мире. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; (2): 14–23. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-2-14-23>
2. Schirmeister F., Dieckmann R., Bechlars S., Bier N., Faruque S.M., Strauch E. Genetic and phenotypic analysis of *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 isolated from German and Austrian patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2014; 33(5): 767–78. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-2011-9>.
3. van Bonn S.M., Schraven S.P., Schuldt T., Heimesaat M.M., Mlynski R., Warnke P.C. Chronic otitis media following infection by non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae*: a case report and review of the literature. *Eur. J. Microbiol. Immunol. (Bp)*. 2020; 10(3): 186–91. <https://doi.org/10.1556/1886.2020.0001310.1556/1886.202000013>
4. Kechker P., Senderovich Y., Ken-Dror S., Laviad-Shitrit S., Arakawa E., Halpern M. Otitis media caused by *V. cholerae* O100: a case report and review of the literature. *Front. Microbiol.* 2017; 8: 1619. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01619>
5. Leroy A.G., Lerailler F., Quilici M.L., Bourdon S. *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 otitis in metropolitan France. *Med. Mal. Infect.* 2019; 49(5): 359–61. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2019.03.003> (in French)
6. Díaz-Menéndez M., Alguacil-Guillén M., Bloise I., García-Pallarés M., Mingorance J. A case of otitis externa caused by non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* after exposure at a Mediterranean bathing site. *J. Rev. Esp. Quimioter.* 2018; 31(3): 295–7.
7. Vezzulli L., Grande C., Reid P.C., Hélaouët P., Edwards M., Höfle M.G., et al. Climate influence on *Vibrio* and associated human diseases during the past half-century in the coastal North Atlantic. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2016; 113(34): E5062–71. <https://doi.org/10.1073/pnas.1609157113>
8. Lepuschitz S., Baron S., Larvor E., Granier S.A., Pretzer C., Mach R.L., et al. Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance traits of *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 isolated from a large Austrian lake frequently associated with cases of human infection. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 2600. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02600>
9. Титова С.В., Монахова Е.В., Алексеева Л.П., Писанов Р.В. Молекулярно-генетические основы биооплекообразования как составляющей персистенции *Vibrio cholerae* в водоёмах Российской Федерации. *Экологическая генетика*. 2018; 16(4): 23–32. <https://doi.org/10.17816/ecogen16423-32>
10. Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Водопьянов С.О., Мишанькин Б.Н., Олейников И.П., Круликов В.Д. и др. Молекулярная эпидемиология *Vibrio cholerae* — разработка алгоритма анализа данных полногеномного секвенирования. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2016; 21(3): 146–52. <https://doi.org/10.18821/1560-9529-2016-21-3-146-152>
11. Rule C.S., Park Y.J., Delarosa J.R., Turley S., Hol W.G.J., McColm S., et al. Suppressor mutations in type II secretion mutants of *Vibrio cholerae*: inactivation of the VesC protease. *mSphere*. 2020; 5(6): e01125-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.01125-20>
12. Crisan C.V., Hammer B.K. The *Vibrio cholerae* type VI secretion system: toxins, regulators and consequences. *Environ. Microbiol.* 2020; 22(10): 4112–22. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14976>
13. Монахова Е.В., Архангельская И.В., Титова С.В., Писанов Р.В. MSHA-подобные пили нетоксигенных штаммов холерных вибрионов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; (3): 75–80. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2019-3-75-80>
14. Awasthi S.P., Asakura M., Chowdury N., Neogi S.B., Hinenoya A., Golbar H.M., et al. Novel cholix toxin variants, ADP-ribosylating toxins in *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 strains, and their pathogenicity. *Infect. Immun.* 2013; 81(2): 531–41. <https://doi.org/10.1128/IAI.00982-12>
15. Lugo M.R., Merrill A.R. The father, son and cholix toxin: the third member of the DT group mono-ADP-ribosyltransferase toxin family. *Toxins (Basel)*. 2015; 7(8): 2757–72. <https://doi.org/10.3390/toxins7082757>
16. Монахова Е.В., Архангельская И.В., Писанов Р.В., Титова С.В. Особенности первичной структуры цитотоксина MARTX нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* разных серогрупп. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018; (3): 73–7. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2018-3-73-77>
17. Vaitkevicius K., Rompikuntal P.K., Lindmark B., Vaitkevicius R., Song T., Wai S.N. The metalloprotease PrtV from

- Vibrio cholerae*. *FEBS J.* 2008; 275(12): 3167–77. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06470.x>
18. Park B.R., Zielke R.A., Wierzbicki I.H., Mitchell K.C., Withey J.H., Sikora A.E. A metalloprotease secreted by the type II secretion system links *Vibrio cholerae* with collagen. *J. Bacteriol.* 2015; 197(6): 1051–64. <https://doi.org/10.1128/JB.02329-14>
 19. Syngkon A., Elluri S., Koley H., Rompikuntal P.K., Saha D.R., Chakrabarti M.K., et al. Studies on a novel serine protease of a Δ hap Δ prtV *Vibrio cholerae* O1 strain and its role in hemorrhagic response in the rabbit ileal loop model. *PLoS One.* 2010; 5(9): e13122. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013122>
 20. Hatzios S.K., Abel S., Martell J., Hubbard T., Sasabe J., Munera D., et al. Chemoproteomic profiling of host and pathogen enzymes active in cholera. *Nat. Chem. Biol.* 2016; 12(4): 268–74. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2025>
 21. Gadwal S., Johnson T.L., Remmer H., Sandkvist M. C-terminal processing of GlyGly-CTERM containing proteins by rhombosortase in *Vibrio cholerae*. *PLoS Pathog.* 2018; 14(10): e1007341. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007341>
 22. Монахова Е.В., Федоренко Г.М., Мазрухо А.Б., Писанов Р.В., Кругликов В.Д., Маркина О.В. и др. Изучение биологического действия цитотонического фактора Cef холерных вибрионов на моделях *in vitro* и *in vivo*. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2012; (1): 62–5.
 23. Blokesch M. Competence-induced type VI secretion might foster intestinal colonization by *Vibrio cholerae*: intestinal interbacterial killing by competence-induced *V. cholerae*. *Bioessays.* 2015; 37(11): 1163–8. <https://doi.org/10.1002/bies.201500101>
 24. Pukatzki S., Provenzano D. *Vibrio cholerae* as a predator: lessons from evolutionary principles. *Front. Microbiol.* 2013; 4: 384. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00384>
 25. Dong T.G., Ho B.T., Yoder-Himes D.R., Mekalanos J.J. Identification of T6SS-dependent effector and immunity proteins by Tn-seq in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2013; 110(7): 2623–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222783110>
 26. Shin O.S., Tam V.C., Suzuki M., Ritchie J.M., Bronson R.T., Waldor M.K., et al. Type III secretion is essential for the rapidly fatal diarrheal disease caused by non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae*. *mBio.* 2011; 2(3): e00106-11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00106-11>
 27. Dzejman M., Serruto D., Tam V.C., Sturtevant D., Diraphat P., Faruque S.M., et al. Genomic characterization of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* reveals genes for a type III secretion system. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2005; 102(90): 3465–70. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409918102>
 28. Shi L., Fujihara K., Sato T., Ito H., Garg P., Chakrabarty R., et al. Distribution and characterization of integrons in various serogroups of *Vibrio cholerae* strains isolated from diarrhoeal patients between 1992 and 2000 in Kolkata, India. *J. Med. Microbiol.* 2006; 55(Pt. 5): 575–83. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46339-0>
 29. Verma J., Bag S., Saha B., Kumar P., Ghosh T.S., Dayal M., et al. Genomic plasticity associated with antimicrobial resistance in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2019; 116(13): 6226–31. <https://doi.org/10.1073/pnas.1900141116>
 30. Das B., Verma J., Kumar P., Ghosh A., Ramamurthy T. Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae*: understanding the ecology of resistance genes and mechanisms. *Vaccine.* 2020; 38(Suppl. 1): A83–92. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.06.031>
 31. *my osobo opasnykh infektsiy.* 2016; (2): 14–23. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-2-14-23> (in Russian)
 2. Schirmeister F., Dieckmann R., Bechlars S., Bier N., Faruque S.M., Strauch E. Genetic and phenotypic analysis of *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 isolated from German and Austrian patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2014; 33(5): 767–78. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-2011-9>
 3. van Bonn S.M., Schraven S.P., Schuldt T., Heimesaat M.M., Mlynski R., Warnke P.C. Chronic otitis media following infection by non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae*: a case report and review of the literature. *Eur. J. Microbiol. Immunol. (Bp).* 2020; 10(3): 186–91. <https://doi.org/10.1556/1886.2020.0001310.1556/1886.2020.00013>
 4. Kechker P., Senderovich Y., Ken-Dror S., Laviad-Shitrit S., Arakawa E., Halpern M. Otitis media caused by *V. cholerae* O100: a case report and review of the literature. *Front. Microbiol.* 2017; 8: 1619. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01619>
 5. Leroy A.G., Lerailler F., Quilici M.L., Bourdon S. *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 otitis in metropolitan France. *Med. Mal. Infect.* 2019; 49(5): 359–61. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2019.03.003> (in French)
 6. Diaz-Menéndez M., Alguacil-Guillén M., Bloise I., García-Pallarés M., Mingorance J. A case of otitis externa caused by non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* after exposure at a Mediterranean bathing site. *J. Rev. Esp. Quimioter.* 2018; 31(3): 295–7.
 7. Vezzulli L., Grande C., Reid P.C., Hélaouët P., Edwards M., Höfle M.G., et al. Climate influence on *Vibrio* and associated human diseases during the past half-century in the coastal North Atlantic. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2016; 113(34): E5062–71. <https://doi.org/10.1073/pnas.1609157113>
 8. Lepuschitz S., Baron S., Larvor E., Granier S.A., Pretzer C., Mach R.L., et al. Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance traits of *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 isolated from a large Austrian lake frequently associated with cases of human infection. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 2600. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02600>
 9. Titova S.V., Monakhova E.V., Alekseeva L.P., Pisanov R.V. Molecular genetic basis of biofilm formation as a component of *Vibrio cholerae* persistence in water reservoirs of Russian Federation. *Ekologicheskaya genetika.* 2018; 16(4): 23–32. <https://doi.org/10.17816/ecogen16423-32> (in Russian)
 10. Vodop'yanov A.S., Pisanov R.V., Vodop'yanov S.O., Mishan'kin B.N., Oleynikov I.P., Kругликов V.D., et al. Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* — development of the algorithm for data analysis of whole genome sequencing. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni.* 2016; 21(3): 146–52. <https://doi.org/10.18821/1560-9529-2016-21-3-146-152> (in Russian)
 11. Rule C.S., Park Y.J., Delarosa J.R., Turley S., Hol W.G.J., McCole S., et al. Suppressor mutations in type II secretion mutants of *Vibrio cholerae*: inactivation of the VesC protease. *mSphere.* 2020; 5(6): e01125-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.01125-20>
 12. Crisan C.V., Hammer B.K. The *Vibrio cholerae* type VI secretion system: toxins, regulators and consequences. *Environ. Microbiol.* 2020; 22(10): 4112–22. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14976>
 13. Monakhova E.V., Arkhangel'skaya I.V., Titova S.V., Pisanov R.V. MSHA-like pili of non-toxicogenic *Vibrio cholerae* strains. *Problemy osobo opasnykh infektsiy.* 2019; (3): 75–80. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2019-3-75-80>
 14. Awasthi S.P., Asakura M., Chowdury N., Neogi S.B., Hinenoya A., Golbar H.M., et al. Novel cholix toxin variants, ADP-ribosylating toxins in *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 strains, and their pathogenicity. *Infect. Immun.* 2013; 81(2): 531–41. <https://doi.org/10.1128/IAI.00982-12>
 15. Lugo M.R., Merrill A.R. The father, son and cholix toxin: the third member of the DT group mono-ADP-ribosyltransferase toxin family. *Toxins (Basel).* 2015; 7(8): 2757–72. <https://doi.org/10.3390/toxins7082757>

REFERENCES

16. Monakhova E.V., Arkhangel'skaya I.V., Pisanov R.V., Titova S.V. Peculiarities of primary martx cytotoxin structure in non-toxigenic *Vibrio cholerae* strains of different serogroups. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2018; (3): 73–77. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2018-3-73-77> (in Russian)
17. Vaitkevicius K., Rompikuntal P.K., Lindmark B., Vaitkevicius R., Song T., Wai S.N. The metalloprotease PrtV from *Vibrio cholerae*. *FEBS J*. 2008; 275(12): 3167–77. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06470.x>
18. Park B.R., Zielke R.A., Wierzbicki I.H., Mitchell K.C., Withey J.H., Sikora A.E. A metalloprotease secreted by the type II secretion system links *Vibrio cholerae* with collagen. *J. Bacteriol*. 2015; 197(6): 1051–64. <https://doi.org/10.1128/JB.02329-14>
19. Syngkon A., Elluri S., Koley H., Rompikuntal P.K., Saha D.R., Chakrabarti M.K., et al. Studies on a novel serine protease of a ΔhapAΔprtV *Vibrio cholerae* O1 strain and its role in hemorrhagic response in the rabbit ileal loop model. *PLoS One*. 2010; 5(9): e13122. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013122>
20. Hatzios S.K., Abel S., Martell J., Hubbard T., Sasabe J., Munera D., et al. Chemoproteomic profiling of host and pathogen enzymes active in cholera. *Nat. Chem. Biol*. 2016; 12(4): 268–74. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2025>
21. Gadwal S., Johnson T.L., Remmer H., Sandkvist M. C-terminal processing of GlyGly-CTERM containing proteins by rhombosortase in *Vibrio cholerae*. *PLoS Pathog*. 2018; 14(10): e1007341. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007341>
22. Monakhova E.V., Fedorenko G.M., Mazrukho A.B., Pisanov R.V., Kruglikov V.D., Markina O.V., et al. Study of biological effect of cho-cell elongating factor of *Vibrio cholerae* on models *in vitro* and *in vivo*. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2012; (1): 62–5. (in Russian)
23. Blokesch M. Competence-induced type VI secretion might foster intestinal colonization by *Vibrio cholerae*: intestinal inter-bacterial killing by competence-induced *V. cholerae*. *Bioessays*. 2015; 37(11): 1163–8. <https://doi.org/10.1002/bies.201500101>
24. Pukatzki S., Provenzano D. *Vibrio cholerae* as a predator: lessons from evolutionary principles. *Front. Microbiol*. 2013; 4: 384. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00384>
25. Dong T.G., Ho B.T., Yoder-Himes D.R., Mekalanos J.J. Identification of T6SS-dependent effector and immunity proteins by Tn-seq in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2013; 110(7): 2623–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222783110>
26. Shin O.S., Tam V.C., Suzuki M., Ritchie J.M., Bronson R.T., Waldor M.K., et al. Type III secretion is essential for the rapidly fatal diarrheal disease caused by non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae*. *mBio*. 2011; 2(3): e00106-11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00106-11>
27. Dzejman M., Serruto D., Tam V.C., Sturtevant D., Diraphat P., Faruque S.M., et al. Genomic characterization of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* reveals genes for a type III secretion system. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2005; 102(90): 3465–70. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409918102>
28. Shi L., Fujihara K., Sato T., Ito H., Garg P., Chakrabarty R., et al. Distribution and characterization of integrons in various serogroups of *Vibrio cholerae* strains isolated from diarrhoeal patients between 1992 and 2000 in Kolkata, India. *J. Med. Microbiol*. 2006; 55(Pt. 5): 575–83. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46339-0>
29. Verma J., Bag S., Saha B., Kumar P., Ghosh T.S., Dayal M., et al. Genomic plasticity associated with antimicrobial resistance in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2019; 116(13): 6226–31. <https://doi.org/10.1073/pnas.1900141116>
30. Das B., Verma J., Kumar P., Ghosh A., Ramamurthy T. Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae*: understanding the ecology of resistance genes and mechanisms. *Vaccine*. 2020; 38(Suppl. 1): A83–92. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.06.031>

Информация об авторах

Монахова Елена Владимировна[✉] — д.б.н., г.н.с. отдела микробиологии холеры и других острых кишечных инфекций Ростовского-на-Дону противочумного института, Ростов-на-Дону, Россия, monakhova_ev@antiplague.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9216-7777>

Водопьянов Алексей Сергеевич — к.м.н., с.н.с. лаб. молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций Ростовского-на-Дону противочумного института, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>

Кругликов Владимир Дмитриевич — д.м.н., начальник отдела микробиологии холеры и других острых кишечных инфекций Ростовского-на-Дону противочумного института, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6540-2778>

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

Писанов Руслан Вячеславович — к.б.н., зав. лаб. молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций Ростовского-на-Дону противочумного института, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7178-8021>

Носков Алексей Кимович — к.м.н., директор Ростовского-на-Дону противочумного института, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-05502221>

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

Статья поступила в редакцию 30.12.2021;
принята к публикации 28.03.2022;
опубликована 30.08.2022

Information about the authors

Elena V. Monakhova[✉] — D. Sci. (Biol.), chief researcher, Department of microbiology of cholera and other acute intestinal infections, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, monakhova_ev@antiplague.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9216-7777>

Alexey S. Vodopyanov — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of molecular biology of natural focal and zoonotic infections, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>

Vladimir D. Kruglikov — D. Sci. (Med.), Head, Department of microbiology of cholera and other acute intestinal infections, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, <https://orcid.org/0000-0002-6540-2778>

Nadezhda A. Selyanskaya — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Department of microbiology of cholera and other acute intestinal infections, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, <https://orcid.org/0000-0002-0008-4705>

Ruslan V. Pisanov — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of molecular biology of natural focal and zoonotic infections, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, <https://orcid.org/0000-0002-7178-8021>

Alexey K. Noskov — Cand. Sci. (Med.), Director, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, <https://orcid.org/0000-0003-05502221>

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

The article was submitted 30.12.2021;
accepted for publication 28.03.2022;
published 30.08.2022

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-275>

Нуклеотидные тетрамеры TCGA и CTAG: вирусные ДНК и генетический код (гипотеза)

Филатов Ф.П.

Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

Аннотация

Введение. Литературные и наши собственные данные показывают, что в частотных профилях (ЧП) герпесвирусных ДНК тетрануклеотиды CTAG и, в меньшей степени, TCGA выделяются среди других полных, билатерально симметричных тетрануклеотидов заметно более низкими значениями концентраций.

Цель работы — сравнительный анализ ЧП тетрануклеотидов CTAG и TCGA в вирусных ДНК.

Материалы и методы. Проанализированы ЧП и другие особенности указанных двух тетрамеров в ДНК не менее одного вида вирусов каждого рода (или субсемейства, если оно не классифицировано по родам) в соответствии с ограничениями по размеру (не ниже 100 000 пар оснований) — всего свыше 200 видов вирусов. Для анализа использованы инструменты GenBank.

Результаты. Описаны две группы формальных особенностей тетрамеров TCGA и CTAG. Одна из них относится к результатам анализа ЧП этих тетрануклеотидов в вирусных ДНК и показывает, что в ДНК с GC:AT > 2 имеют место определённые симметрии ЧП nCGn при частом нарушении таких симметрий в ЧП nTAn из-за недопредставленности CTAG. Другая группа особенностей этих тетрамеров демонстрирует различия их ЧП в полных ДНК вирусов и в их геномах (кодирующей части, которая у некоторых исследованных вирусов достигает 80%, делая анализ их ДНК более убедительным, нежели анализ ДНК клеточных форм жизни) и указывает на возможную роль этих тетрамеров в происхождении универсального генетического кода.

Обсуждение. Предполагается, что генетический код первоначально формировался на основе некоторого преобладания C+G в «до-кодовых» ДНК-полимерах с последующей эволюцией стартовых форм кода до конечной фиксированной структуры, в которой тетрамеры TCGA и CTAG занимают центральное место, отражая исходные этапы этой эволюции. Симметрии ЧП nCGn, характерные для «полной» ДНК герпесвирусов рода Simplex, исчезают в цепи вторых кодонных букв генома этих вирусов, косвенно указывая на отличия их функций от функций других букв и подчёркивая целесообразность представления генетического кода в формате каллиграммы, в которой вторая строка не симметрична.

Ключевые слова: вирусная ДНК, функции тетрамеров TCGA и CTAG, частотный профиль nCGn и nTAn, симметрии генетического кода

Источник финансирования. Автор заявляет об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Филатов Ф.П. Нуклеотидные тетрамеры TCGA и CTAG: вирусные ДНК и генетический код (гипотеза). *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(4):478–493. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-275>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-275>

Nucleotide tetramers TCGA and CTAG: viral DNA and the genetic code (hypothesis)

Felix P. Filatov

I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia;
National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. The published and our own data show that CTAG and, to a lesser extent, TCGA tetra-nucleotides have significantly lower concentrations in frequency profiles (FPs) of herpesvirus DNAs compared to other complete, bilaterally symmetrical tetra-nucleotides.

The aim of the study is to present a comparative analysis of CTAG and TCGA tetra-nucleotide FPs in viral DNAs.

Materials and methods. We have analyzed FPs and other characteristics of the two above tetramers in DNAs of at least one species of viruses of each genus (or each subfamily, if the classification into genera was not available), complying with the size limit requirements (minimum 100,000 base pairs) — a total of more than 200 species of viruses. The analysis was performed using the GenBank database.

Results. Two groups of characteristics of TCGA and CTAG tetramers have been described. One of them covers the results of the FP analysis for these tetranucleotides in viral DNAs and shows that DNAs with GC:AT > 2 are characterized by nCGn FP symmetries while these symmetries are frequently distorted in nTAn FP due to CTAG underrepresentation. The other group of tetramer characteristics demonstrates differences in their FPs in complete viral DNAs and in their genomes (a coding part, which can reach 80% in some studied viruses, thus making the analysis of their DNAs more significant than the analysis of DNAs of cellular live forms) and suggests that these tetramers may have participated in the origin of the universal genetic code.

Discussion. Assumedly, the genetic code started evolving amid C+G prevailing in "pre-code" DNA polymers; then the initial code forms evolved further to their final structure where TCGA and CTAG tetramers hold a central position, encapsulating the previous stages of this evolution. The nCGn FP symmetries typical of the "complete" DNA of Herpes simplex viruses disappear in the sequence of the second codon letters of the genome of these viruses, implying that their functions differ from functions of other letters and emphasizing the reasonableness of presenting the genetic code as a calligram where the second line is not symmetrical.

Keywords: *viral DNA, functions of TCGA and CTAG tetramers, frequency profile of nCGn and nTAn, symmetries of the genetic code*

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

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

For citation: Filatov F.P. Nucleotide tetramers TCGA and CTAG: viral DNA and the genetic code (hypothesis). *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii.* 2022;99(4):478–493.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-275>

Введение

Ранее мы описали частоту встречаемости билатерально симметричных, полных (состоящих из 4 оснований) тетрануклеотидов (ТН) в геномах герпесвирусов [1]. Обнаружив тогда, что частотные профили (ЧП) двух ТН — СТАГ и, в меньшей степени, ТСГА — герпесвирусных ДНК выделяются заметно низкими значениями концентраций, на что указывают и данные литературы [2–4], мы более внимательно проанализировали другие особенности этих двух ТН и вывели такой анализ за пределы герпесвирусов.

Предполагается, что действие СТАГ связано с нарушением оптимальной структуры створочных петель нуклеиновой кислоты, что приводит к торможению репликации ДНК («термодинамическая модель»). Кроме того, последовательность СТАГ более подвержена химическим воздействиям [5, 6]. Пониженная концентрация ТСГА связана с его центральным димером СrG, который часто метилируется и отличается высокой частотой мутаций [7–10].

Мы приводим здесь многочисленные ссылки на источники (на самом деле работ, посвящённых этой теме, намного больше), чтобы показать разнообразие последствий наличия обсуждаемых олигонуклеотидов в ДНК и геномах живых организмов [11]. Нежелательное ингибирование биологических синтезов компенсируется снижением концентрации в

ДНК обоих ТН. Нас в данной работе интересовали в первую очередь формальные характеристики обоих ТН, которые, в отличие от остальных, обладают биологическими функциями, какими бы ни были функции и механизмы, их определяющие. Эти характеристики демонстрируют неожиданные особенности, объяснение которых изложено здесь в порядке весьма предварительной гипотезы.

Цель работы — сравнительный анализ ЧП СТАГ и ТСГА в вирусных ДНК и в геномных участках этих ДНК.

Мы анализировали ближайший контекст центральных пар СG и ТА нуклеотидных тетрамеров, среди которых — ТСГА и СТАГ, в ДНК вирусов различных классификационных групп. Такой подход несколько уравнивает оценку сравнения ЧП динуклеотида СG и СТАГ, сближая их размеры и рассматривая их одновременно и как тетрамеры, и как димеры (тем более что в литературе отмечаются также сходные по функции, пусть и в значительно меньшей степени, характеристики центрального димера СТАГ [12, 13]). Минус этого подхода заключается в значительно меньшем различии плотности симметричных пар тетрамеров с общей функцией (ТСГА и АCGT) по сравнению с существенной разницей плотности симметричных пар тетрамеров, имеющих (СТАГ) и практически не имеющих (GTAC) такую функцию.

Материалы и методы

Аналізу подвергались физически несегментированные ДНК, полноразмерный сиквенс которых представлен в GenBank¹ на 2021 г. Третий ограничивающий фактор — размер ДНК, который в первом приближении должен быть не ниже 100 т.п.н., как и в случае со Вторым правилом Чаргаффа [5, 14, 15], и не выше 300–400 т.п.н. ДНК последних отличается слишком сложные вирусы и содержит преимущественно А+Т. Самые большие известные вирусные РНК — геномы коронавируса — составляют не более 32–35 т.п.н.

Указанным выше условиям удовлетворяют геномы вирусов только двух больших доменов общего надцарства *Vira*: *Duplodnaviria* (царство *Heunggongvirae*) и *Varidnaviria* (царство *Bamfordvirae*). Мы проанализировали ДНК не менее одного вида вирусов каждого рода (или семейства, если оно не классифицировано по родам); всего таких родов — свыше 200 (20 семейств). Исследованные нами вирусы первого домена принадлежат к типам *Uroviricota* царства *Heunggongvirae* (отряд *Caudovirales*) и *Peploviricota* того же царства (отряд *Herpesvirales*). Исследованные вирусы второго домена принадлежат к типу *Nucleocytoviricota* классов *Megaviricetes* и *Pokkesviricetes*. Кроме того, мы проанализировали ДНК вирусов без установленных промежуточных доменов: 9 представителей семейств *Baculoviridae*, *Nudiviridae* и суперсемейства *Nimaviridae*, а также 6 представителей неклассифицированных видов вирусов архей и 3 неклассифицированных вида семейств *Pytho-* и *Hytrosaviridae* (Приложение).

В качестве инструментов анализа использовали пакеты программ GenBank.

Графики частотного распределения изучаемых ТН строили перебором вариантов ближайшего контекста центральных пар пТАн и пСГн (СТАГ) с последовательным повышением молекулярной массы п [16, 17]:



где С, Т — пиримидины (_Y); А, G — пурины (_R).

Результаты

Плотность минимальных пТАн и пСГн в вирусных ДНК

Общий анализ плотности пТАн и пСГн показал, что в ДНК большей части (75 из 128) исследованных представителей типа *Uroviricota* минимальный ТН — это СТАГ_{min}. Минимальным мы называем здесь полный самокомплементарный тетрамер, плотность которого ниже, чем плотность симметричного ему по контекстным основаниям тетра-

мера в общем ЧП вирусной ДНК. В нашем случае СТАГ_{min} < GTAC и TCGA_{min} < ACGT.

ДНК ни одного вида типа *Uroviricota* не содержит TCGA в качестве минимального тетрамера. В ДНК вирусов типа *Nucleocytoviricota*, вирусов неутонченной классификации (*Baculoviridae*, *Nudiviridae* и *Nimaviridae*) и вирусов архей TCGA_{min}, хотя и встречается, но редко и без видимой связи с классификационными группами.

Один из иридовирусов — альфа-иридовирус, а также вирус инфекционного некроза селезенки и почек человека содержат в своей ДНК оба названных ТН в качестве минимальных и примерно в равных концентрациях (СТАГ_{min} ~ TCGA_{min}). Та же особенность относится и к вирусу *Ranid 1* семейства *Alloherpesviridae*. ДНК значительной части альфа-герпесвирусов человека рода *Simplex* содержит эти тетрамеры в качестве минимальных при СТАГ_{min} < TCGA_{min}.

TCGA не является минимальным в ДНК розеоловирусов. В то же время большая часть герпесвирусов ДНК (26 из 35) — кроме гамма-герпесвирусов — имеет в качестве минимального СТАГ. Раздел 2 детализирует особенности ЧП пТАн и пСГн в ДНК герпесвирусов.

Минимальной концентрацией СТАГ отличаются все исследованные *Nucleocytoviricota* — за исключением поксвирусов, среди которых только 3 хордопоксвируса (из 19 анализированных) имеют СТАГ_{min}. Поксвирусы, как было сказано, отличаются также ДНК с преобладающим типом А+Т и с высоким (> 2) соотношением [Т+А] : [G+C].

Подытоживая эту часть работы, отметим следующее:

1) ДНК герпесвирусов выделяется среди ДНК других исследованных здесь вирусов соотношением [G+C] > [A+T];

2) среди изученных вирусных ДНК тетрамер TCGA характерен как минимальный, почти исключительно для ДНК герпесвирусов — с более чем двойным преобладанием G+C над А+Т. Это в первую очередь герпесвирусы рода *Simplexviruses* семейства *Alpha* и частично рода *Lymphocryptoviruses* субсемейства *Gamma*. ДНК многих герпесвирусов имеют в качестве минимального тетрамер ACGT, но он не уникален, т.е. встречается в этом качестве в ДНК других классификационных групп вирусов.

Частотный профиль тетрауклеотидов в вирусных ДНК

Яркой характеристикой количественного распределения геномных тетрамеров пСГн некоторых вирусов типа *Peploviricota* является симметрия их ЧП. **Рисунок 1** демонстрирует её для вируса простого герпеса-1, чей геном организован по типу D [18]. При этом ЧП пТАн асимметричен в силу «минимальности» СТАГ (СТАГ_{min}). Более строгим, чем

¹ URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/Genomes_Group.cgi?taxid=10239&sort=taxonomy

симметрия, но также её отражающим является соотношение $CTAG : GTAC$ и $TCGA : ACGT$. Для ДНК вируса простого герпеса-1 — это $CTAG_{min} < GTAC$ (21%) и $TCGA_{min} < ACGT$ (86%).

Достаточно заменить центральный димер тетрамера $CTAG$ на обратный — $CATG$, как симметрия соответствующего ЧП восстанавливается. Асимметрия ЧП $nCGn$ выражена намного слабее, хотя для ЧП многих симплексовирусов соотношение $TCGA < ACGT$ весьма характерно. Любые замены центрального димера CG приводят к сильной деформации и нарушению симметрии ЧП.

На **рис. 2** показаны ЧП ТН $nTAn$ и $nCGn$ в *Human Cytomegalovirus (HHV5)* ДНК, организованной, как и в случае герпесвирусов рода *Simplex*, по

типу D. Здесь симметрии обоих ЧП практически не выражены, однако соотношения $CTAG_{min} : GTAC$ и $TCGA_{min} : ACGT$ вполне отчётливы (36 и 52% соответственно). Очевидно, что симметрия ЧП $nCGn$ связана с GC-типом ДНК герпесвируса рода *Simplex*.

Количественное выражение $GC : AT$ и связь его с симметриями ЧП герпесвирусных ДНК иллюстрирует **таблица**. Выраженные симметрии ЧП $nCGn$ обеспечивает соотношение $GC : AT > 2$, что характерно в первую очередь для ДНК герпесвирусов рода *Simplex*. Соотношения пар $TCGA < ACGT$ и $CTAG < GTAC$ характерны в основном также для ДНК вирусов рода *Simplex*. AT-тип вирусных ДНК при соотношении $AT : GC > 2$ (поксвирусы) тоже придаёт симметрию ЧП обсуждаемых ТН.

a / a			
CTAC 1	221	2056	CCGC
CTAT 2	116	892	CCGT
CTAA 3	112	878	CCGA
CTAG 4	91	1856	CCGG
TTAC 5	175	884	TCGC
TTAT 6	182	563	TCGT
TTAA 7	178	468	TCGA
TTAG 8	109	916	TCGG
ATAC 9	200	954	ACGC
ATAT 10	152	546	ACGT
ATAA 11	185	542	ACGA
ATAG 12	128	932	ACGG
GTAC 13	439	1796	GCGC
GTAT 14	223	1022	GCGT
GTAA 15	194	894	GCGA
GTAG 16	251	2160	GCGG
TA			CG
	21%	86%	
e / c			

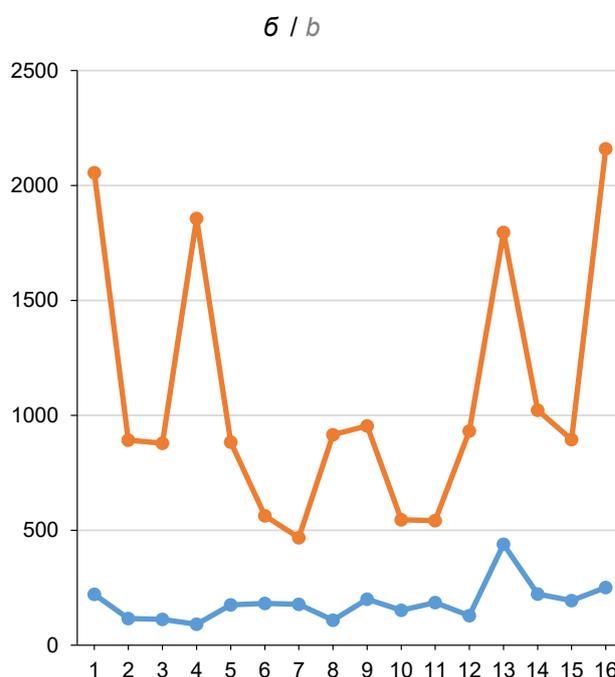
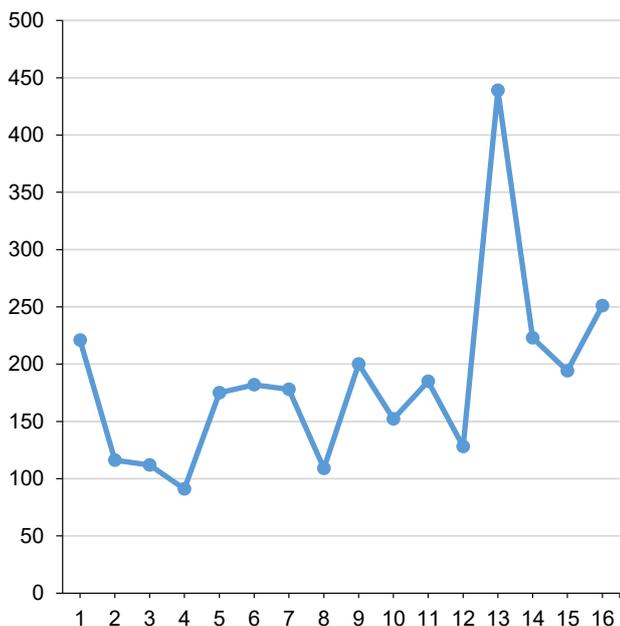


Рис. 1. ЧП тетрануклеотидов $nTAn$ (синий цвет) и $nCGn$ (красный цвет) в *Human Simplexvirus 1 DNA*.

a — абсолютные значения, приведено процентное соотношение симметричных по шкале пар двух полных тетрамеров — $TCGA_{min} : ACGT$ и $CTAG_{UNP} : GTAC$ (окрашены зелёным и выделены жирным шрифтом); б, в — графическое выражение абсолютных значений; в — ЧП $nTAn$, больший масштаб по вертикали.

Fig. 1. FPs of $nTAn$ (blue) and $nCGn$ (red) tetra-nucleotides in *Human Simplexvirus 1 DNA*.

a — absolute values; the percentage ratio of symmetric pairs of two complete tetramers — $TCGA_{min} : ACGT$ and $CTAG_{UNP} : GTAC$ (shown in green and bold); b, c — a graphic representation of absolute values; c — $nTAn$ FP; vertical scale up.

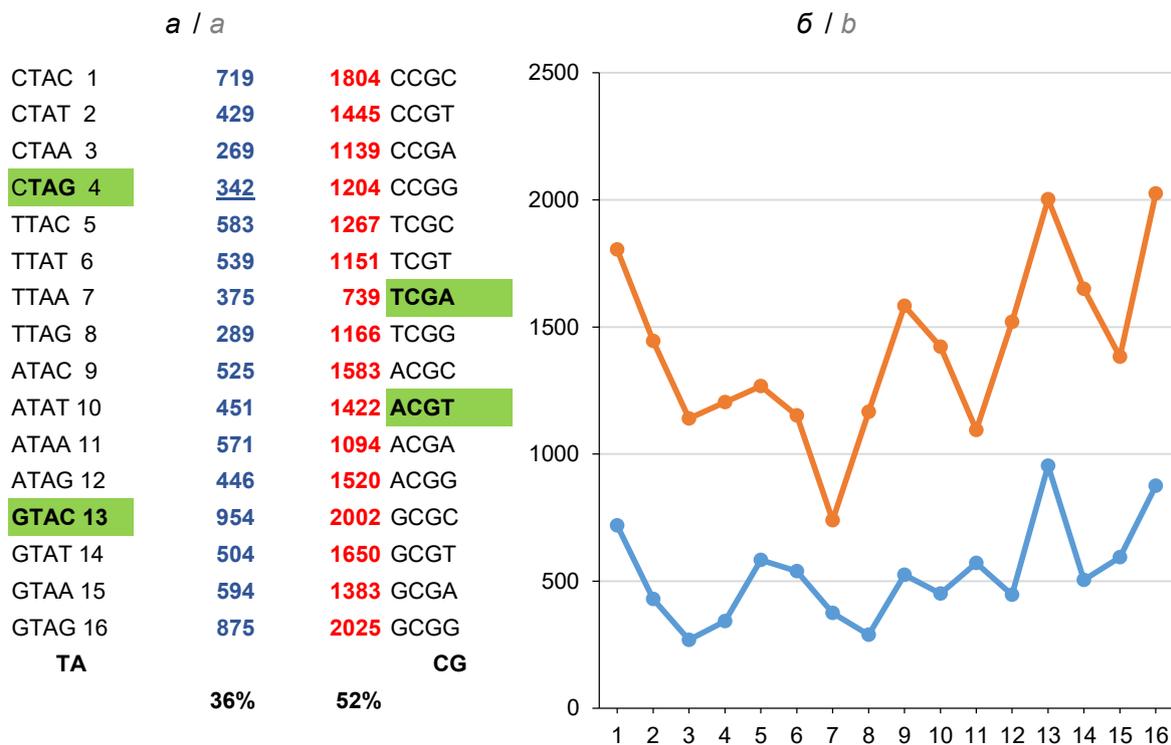


Рис. 2. Частотные профили тетрануклеотидов nTAn (синий цвет) и nCGn (красный цвет) в *Human Cytomegalovirus (HHV5) DNA*.

a — абсолютные значения; б — их графическое выражение. Показано процентное соотношение симметричных по шкале пар двух полных тетрамеров, ACGT : TCGA и GTAC : CTAG (окрашены зелёным и выделены жирным шрифтом).

Fig. 2. Frequency profiles of nTAn (blue) and nCGn (red) tetra-nucleotides in the *Human Cytomegalovirus (HHV5) DNA*.

a — absolute values; b — their graphic representation. The percentage ratio of symmetrical pairs of two complete tetramers, ACGT:TCGA and GTAC:CTAG (shown in green and in bold).

Рисунок 3 показывает ЧП CTAG и TCGA в ДНК *Ranid herpesvirus 1, (Batrachovirus)*, в которой оба ТН находятся в минимальных позициях своих ЧП, а геном организован по типу В Ройзмана. ЧП обоих ТН в ДНК этого вируса симметрий не демонстрируют, но весьма отчётливо выделяют снижением плотности так называемые неполные тетрамеры — тримеры СТА/TAG и CCG/CGA. В определённой мере это характерно и для ряда других вирусных ДНК. Плотность таких тринуклеотидов, как правило, не достигает значений полных CTAG или TCGA.

Подытоживая эту часть работы, отметим две выраженные, не упоминавшиеся прежде формальные особенности CTAG и TCGA.

ЧП nCGn в ДНК $[G+C] : [A+T] > 2$ отличаются определённой симметрией, в то время как симметрия ЧП nTAn в таких ДНК часто нарушена (CTAG < GTAC). Эта симметрия не тождественна Второму правилу Чаргаффа, которое, по крайней мере, не имеет таких ограничений и даже не является следствием этого правила, как это может показаться на первый взгляд. Она также отлична от типа симметрий ДНК-последовательностей, описаного в работах [19–21].

Не только CTAG, но и его тринуклеотидные взаимоперекрывающиеся участки nTAG и СТАn имеют, как правило, более или менее выраженную тенденцию к снижению плотности в ЧП соответствующих тетрамеров (рис. 2). Тенденцию к снижению плотности демонстрируют также тримеры nCGA и TCGn. Если учитывать в качестве минимальных тримеры nTAG или СТАn, перекрывающиеся 5'- или 3'-участки $CTAG_{min}$, то упомянутое в разделе 1 в отношении ДНК исследованных представителей типа *Uroviricota* число 75 $CTAG_{min}$ из 128 исследованных увеличивается до 93. Такие тринуклеотиды также имеют тенденцию к снижению частоты, которая, как правило, не достигает минимальных значений полного $CTAG_{min}$. На наш взгляд, это требует некоторого уточнения упомянутой выше гипотезы термодинамической модели, которая относится к полному ТН CTAG.

Для этих четырех тринуклеотидов (СТА/TAG, частично перекрывающихся CTAG, и TCG/CGA, частично перекрывающихся TCGA) характерна ещё одна совершенно неожиданная особенность, которая, на первый взгляд, не связана с их известными функциями; фактически она относится к следующему разделу и здесь используется лишь как

Характеристики 1-х (А) и 3-х (G) строк вирусных (в основном герпесвирусных) геномов с соотношением GC : AT > 1
 Characteristics of the 1st (A) and 3rd (G) lines of virus (mainly herpesvirus) genomes with ratio GC : AT > 1

Род / Genus	Вид / Species	GC : AT	ДНК / DNA	Геном / Genome	
				1-й ТН / 1 st nt	3-й ТН / 3 rd nt
<i>Simplexvirus</i>	<i>Papiine HV2</i>	3,18	acgt	TCGA	–
<i>Simplexvirus</i>	<i>Cercopithec aHV2</i>	3,16	acgt	TCGA	TCGA
<i>Simplexvirus</i>	<i>Ateline aHV1</i>	3,08	acgt	TCGA	TCGA
<i>Simplexvirus</i>	<i>Macacine aHV1</i>	2,92	acgt	TCGA	TCGA
<i>Simplexvirus</i>	<i>Human aHV2</i>	2,38	acgt	TCGA	TCGA
<i>Simplexvirus</i>	<i>Human aHV1</i>	2,15	TCGA	TCGA	TCGA
<i>Simplexvirus</i>	<i>Chimpanzee aHV</i>	2,13	TCGA	TCGA	TCGA
<i>Simplexvirus</i>	<i>Saimiriine aHV1</i>	2,04	TCGA	TCGA	TCGA
<i>Quwivirus</i>	<i>Tupaia bHV1</i>	2,00	acgt	acgt	acgt
<i>Simplexvirus</i>	<i>Leporid aHV4</i>	1,97	TCGA	TCGA	acgt
<i>Shapirovirus</i>	<i>Caulobacter phage CcrKarma</i>	1,96	acgt	TCGA	TCGA
<i>Phicbkvirus</i>	<i>Caulobacter virus Rogue</i>	1,95	acgt	acgt	TCGA
<i>Bertelyvirus</i>	<i>Caulobacter phage CcrBL9</i>	1,68	acgt	TCGA	TCGA
<i>Cytomegalovirus</i>	<i>Rat Maastricht</i>	1,56	acgt	TCGA	acgt
<i>Simplexvirus</i>	<i>Fruit bat aHV1</i>	1,55	acgt	TCGA	TCGA
<i>Lymphocryptovirus</i>	<i>Human bHV4</i>	1,47	TCGA	TCGA	TCGA
<i>Muromegalovirus</i>	<i>Murid bHV1</i>	1,42	TCGA	TCGA	acgt
<i>Cytomegalovirus</i>	<i>Human bHV5</i>	1,35	TCGA	TCGA	acgt
<i>Rhadinovirus</i>	<i>Dolphin gHV1</i>	1,32	acgt	acgt	TCGA
<i>Varicellovirus</i>	<i>Equid aHV1</i>	1,31	TCGA	TCGA	TCGA
<i>Quiwivirus</i>	<i>Caviid bHV2</i>	1,22	TCGA	TCGA	acgt
<i>Percavirus</i>	<i>Equid gHV5</i>	1,21	TCGA	TCGA	TCGA
<i>Batrachovirus</i>	<i>Ranid HV1</i>	1,20	TCGA	TCGA	TCGA
<i>Rhadinovirus</i>	<i>Human gHV8</i>	1,16	acgt	acgt	acgt
<i>Mardivirus</i>	<i>Gallid aHV3</i>	1,16	acgt	TCGA	TCGA
<i>Simplexvirus</i>	<i>Macropodid HV1</i>	1,12	acgt	TCGA	TCGA
<i>Batrachovirus</i>	<i>Ranid HV2</i>	1,12	TCGA	TCGA	TCGA
<i>Cyprinivirus</i>	<i>Cyprinid HV1</i>	1,05	acgt	acgt	TCGA

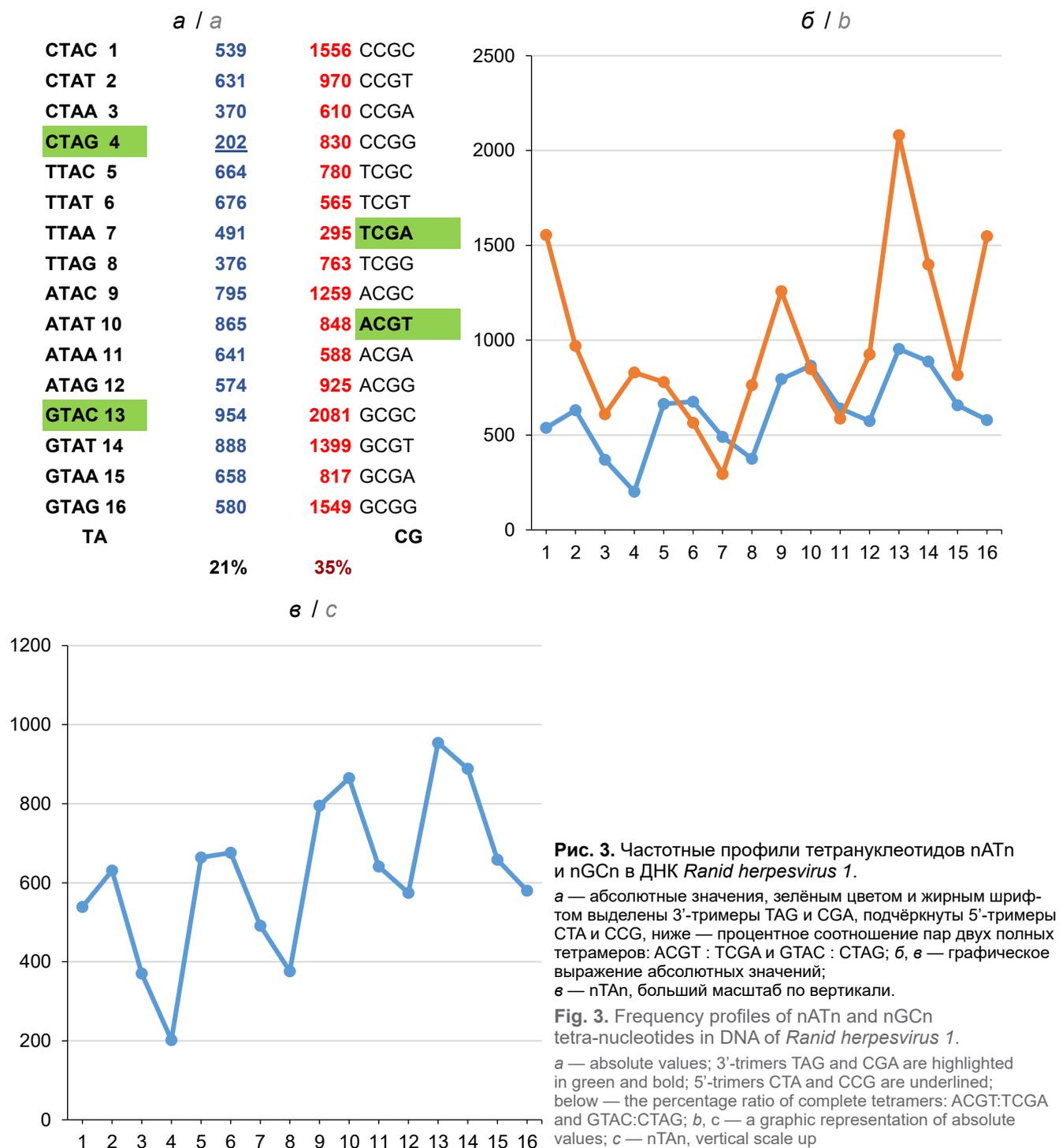
Примечание. Минимальные тетрануклеотиды ЧП nCGn показаны как ACGT или TCGA. Наличие симметрии ЧП обозначено серым цветом ячеек (пояснения в тексте).

Note. Tetra-nucleotides (nCGn) of the minimum concentration are shown as ACGT or TCGA. The FP symmetry is shown in grey color (see the explanation in the text).

переход к нему: рассматриваемые как взаимно перекрывающиеся кодоны, эти 4 тримера полностью исчерпывают избыточность универсального генетического кода (выделено жирным шрифтом; римские цифры указывают на группу их вырожденности): **CTA_{IV} = TTR_{II}(L)** и **TAG_{II} = TGA_{III}(stop)**; **TCG_{IV} = AGY_{II}(S)** и **CGA_{IV} = AGR_{II}(R)**. При этом группа их вырожденности всегда выше группы вырожденности альтернативных кодонов той же аминокислоты.

Альтернативные кодоны составляют симметричную центральную строку А-Т-Т-Т-А (первые

буквы) или S_{II}-stop-L_{II}-stop-R_{II} (продукты кодирования) так называемой матрицы кода [17]. Другой такой, как TCGA и СТАG, пары полных самокомплементарных ТН, которые перекрывались бы тринуклеотидами, обладающими подобными свойствами, в генетическом коде нет. Эта их особенность, возможно случайная, тем не менее заставляет внимательнее пересмотреть в описанном контексте структуру универсального генетического кода и поделиться столь же неожиданными наблюдениями, не всегда объяснимыми, но на наш взгляд, заслуживающими интереса.



Универсальный генетический код и геномные симметрии тетрануклеотидов TCGA и CTAG

Генетический код имеет помехоустойчивую структуру, основой чего является, в частности, симметрия его элементов. Один из наиболее демонстрационных вариантов такой симметрии (исторически первый) представляет таблица Ю. Румера [22, 23], позднее преобразованная В. Щербаком в каллиграмму, которая связывает симметрией первые

буквы кодирующих триплетов и упорядоченные по молекулярной массе продукты кодирования [16]. Такая связь до сих пор не имеет внятного объяснения. В представленной здесь несколько модифицированной таблице (каллиграмма А; **рис. 4, а**) мы отдали приоритет этапам формирования кода — в противовес уже сформированным, фиксированным группам вырожденности, которые показывает исходная каллиграмма. Это подчёркивает преимущественное содержание G+C в первом

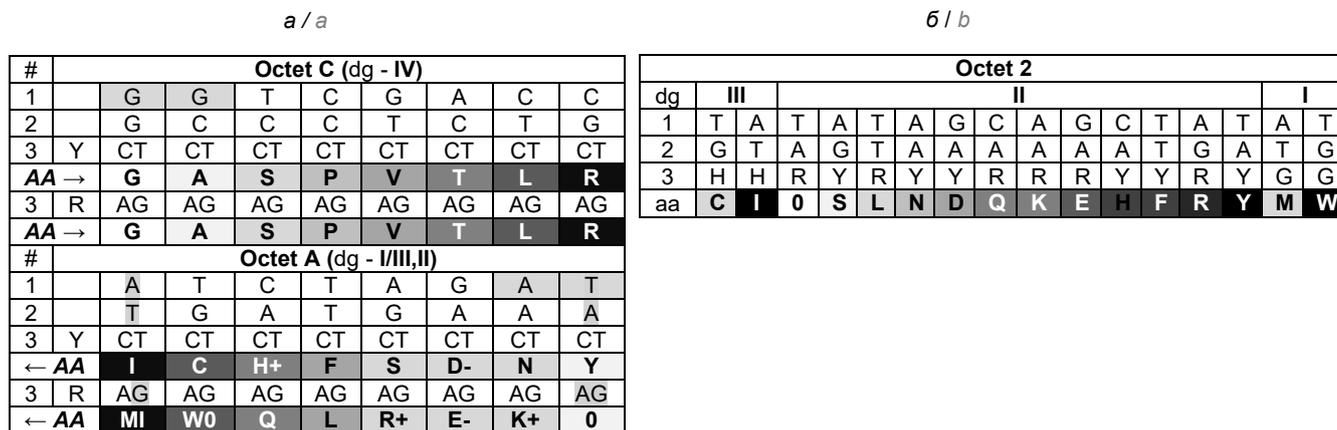


Рис. 4. Каллиграмма А универсального генетического кода (а) и октет 2 каллиграммы универсального генетического кода ([16]; б).

Третий нуклеотид кодона представлен пурином (R) или пиримидином (Y). Стартовый кодон ATG и стоп-кодон TA_R выделены серым по вертикали. Центральные тетра-нуклеотиды первых букв кодонов каждого октета выделены жирным шрифтом. Тетрануклеотид стыка октетов А и С также выделен серым. Последовательное нарастание молекулярной массы продуктов кодирования (AC, аминокислоты) показано нарастанием плотности фона клеток от белого к чёрному и стрелками. Римские цифры — группы вырожденности кода, dg. Три пары продуктов кодирования, часть которых может нести заряд (отчего их позиции в строке неустойчивы и фиксированы по доминирующему правилу — симметрии первых букв кодонов), выделены общим светло-серым фоном.

Fig. 4. Calligram A of the universal genetic code (a) and octet 2 of the calligram of the universal genetic code ([16]; b).

The third nucleotide of the codon is represented by purine (R) or pyrimidine (Y). The start codon ATG and the stop codon TA_R are highlighted vertically in grey. The first letters of central tetra-nucleotide codons of each octet are shown in bold. The tetra-nucleotide of the junction of octets A and C is also highlighted in grey. The successive increase in the molecular weight of the coding products (AC, amino acids) is shown by the increasing background density from white to black and by arrows. Roman numerals are used to denote degeneracy groups of the code, dg. Three pairs of coding products, some of which can bear a charge (that is why their positions in the lines are not stable and fixed following the dominant rule — the symmetry of the first letters of codons), highlighted in light grey.

октете, вероятно, отражающем преимущественное содержание более термостабильных пар G≡C в «до-кодовом» наборе полинуклеотидов, и A+T — во втором, в котором закреплены также направления чтения генов и другие особенности, которые делают второй октет более сложным, т.е., скорее всего, эволюционно более поздним. В нашей версии октет 2 каллиграммы (рис. 4, б) «уплотнён» за счёт того, что в основу последовательности аминокислот положена общая масса продуктов, кодируемых триплетами с третьим пиримидином Y или пурином R. Этот октет обозначен как октет А (рис. 4, а) — по преимущественному суммарному содержанию нуклеотидов А в 1-й и 2-й кодирующих строках. На том же основании октет 1 каллиграммы обозначен здесь как октет С. Количество всех четырех нуклеотидов в первых строках каждого октета равно и подчёркивает таким образом межоктетную симметрию.

Основу организации октета С каллиграммы А составляет последовательное изменение (нарастание) значений молекулярных масс кодируемых аминокислот, которое придаёт октету симметрию нуклеотидов верхней строки (первых букв кодонов). Центром этой симметрии является тетрамер TCGA (выделен жирным шрифтом на сером фоне). Мы опускаем здесь значения молекулярных масс продуктов кодирования, их можно найти в работах [15, 16]. Октеты С и I обеих каллиграмм полностью совпадают.

Основу организации октета А нашей каллиграммы также составляет последовательное изменение (но убывание) значений молекулярных масс кодируемых аминокислот, которое придаёт этому октету симметрию нуклеотидов верхней строки (первых букв кодонов). Некоторую неопределённость весьма близким значениям масс аминокислот, составляющим три пары — R⁺S, E⁻D⁻ и K⁺N (на рис. 4 выделены общим светло-серым цветом), придаёт их колебание за счёт способности нести заряд (протонирования). Однако доминирующий принцип организации октетов, а именно симметрия первых букв кодирующих триплетов, фиксирует центральный тетрамер СТАG в составе верхней строки октета А, помещая в четвертую позицию тетрамера глутаминовую кислоту. Возможно, некоторую роль играет здесь симметрия зарядов гистидина (H⁺) и глутамина (D⁻) при нейтральном рН, в кодонах которых третьи буквы — пиримидины. Два эти фактора — последовательное изменение молекулярной массы кодируемых продуктов и симметрия первых букв кодонов — определяют направление чтения этого октета и направление чтения генов — от триплета ATG (старт-кодон) к триплетам TGA и TA_R (стоп-кодона).

Оба октета генетического кода могут отражать также его предполагаемую эволюцию [7] — от случайных старт/стоп-кодонов октета С к фиксированным (октет А) кодонам и от преобладания в октете С нуклеотидов G и C к выравниванию их наличия за

счёт доминирования нуклеотидов А и Т в кодонах октета А и к общему усложнению этого октета.

Подход, упомянутый в конце предыдущего раздела, т.е. взаимное перекрывание тетрамеров тримерами, делает каллиграмму несколько более информативной, выделяя также нечётные группы вырожденности. Линейный четырехнуклеотидный «стык» первых строк октетов А и С, т.е. АТ|GG, можно рассматривать как частично перекрывающийся кодонами АТG и TGG группы вырожденности I (обозначено серым на рис. 4, а). Наличие такого стыка подчёркивает разнонаправленность организации октетов А и Cght, формирующей их симметрию — снижение или нарастание нуклонных масс продуктов кодирования при однонаправленных центральных октетных тетрамерах.

Анализ ЧП тетрамеров nCGn и nTAn в условных цепях 1, 2 и 3-х строк вирусных геномов указывает на определённое сходство с симметриями этих ЧП в 1, 2 и 3-х строках генетического кода. Первая из этих цепей начинается с нуклеотида А, вторая — с Т, третья — с G, а гены следуют один за другим без промежутков, независимо от того, в какой цепи вирусных ДНК они локализируются, перекрывают ли друг друга и содержат ли интроны. Примеры этого анализа показаны только для геномов тех же вирусов, что и в предыдущем разделе: HHV1 (рис. 5), HHV5 (рис. 6) и HV Randid 1 (рис. 7).

Рисунок 5, а демонстрирует результат такого анализа, а именно симметрию профиля цепи первых нуклеотидов генома HHV1, в котором тетрамер TCGA остается минимальным, уступая тетрамеру ACGT. Симметрия вторых нуклеотидов отсутствует, как и во 2-й строке каллиграммы кода. Оба этих факта соответствуют функциям 1-х и 2-х нуклеотидов кодона, а их характер (наличие и отсутствие симметрии) следует организации универсального генетического кода. Выраженная симметрия профиля цепи 3-х нуклеотидов генома, которая, на первый взгляд, не является необходимой, поскольку выбор нуклеотидов для неё произволен, наводит на мысль о необходимой компенсации симметрии ЧП цепи первых нуклеотидов генома и ЧП nCGn реальной ДНК HHV1 (рис. 1). Кроме того, сходной симметрией могли характеризоваться нуклеотидные полимеры на этапе, предшествующем формированию генетического кода, или отобранные для его формирования. Анализ полной герпесвирусной ДНК, разделённой на три цепочки по тому же принципу, что и геном, возвращает ЧП nCGn статистический характер, т.е. сходную симметрию по изучаемым тетрамерам для всех 3 цепочек, не привязанных к генам.

Рисунок 5, б показывает сильно искажённую симметрию ЧП nTAn цепочки 1-х букв кодонов — явно в силу небольшого числа тетрамеров nTAn. В принципе то же можно было бы сказать и о TCGA,

но его функциональный димер (CG) даже в прерывистой цепи встречается намного чаще, чем функциональный тетрамер СТАG, и может сохранять иллюзию функции в случае тетрамера скорее, чем в случае декамера CnnTnnAnnG. Надо отметить, что минимальное значение сохраняет и декамер TnnCnnGnnA. Дефицит СТАG в цепочке 1-х букв кодирующих триплетов исчезает, хотя значение СТАG несколько уступает симметричному по шкале GTAC. Как и в случае nCGn (рис. 5, а), ЧП nTAn вторых букв не показывает симметрии, а значения перебираемых тетрамеров 3-й цепочки настолько низки, что ими можно было бы пренебречь, тем не менее они следуют порядку значений 1-х букв и, возможно, тоже участвуют в формировании общей симметрии ЧП nTAn реальной ДНК HHV1.

Рисунок 6 показывает, что ЧП цепочки 1-х и 3-х букв тетрамера nCGn (в меньшей степени nATn) генома бета-герпесвируса HHV5 «восстанавливают» симметрию, отсутствующую в реальной ДНК этого вируса, но теряют характеристики СТАG и TCGA как минимальных. Как и в геноме HHV1, в геноме HHV5 ЧП 2-х букв обоих тетрамеров несимметричен.

Рисунок 7 демонстрирует ЧП обсуждаемых тетрамеров в цепочках 1, 2 и 3-х букв генома аллогерпесвируса *Randid herpesvirus 1*. В какой-то мере и здесь мы видим «восстановление» симметрии ЧП цепочек 1-х и 3-х букв тетрамера nCGn и в меньшей степени — nATn генома по сравнению с этими характеристиками в реальной вирусной ДНК. Характеристики тетрамеров СТАG и TCGA как минимальных при этом сохраняются, хотя их значения сильно снижены.

Полученные данные мы свели в итоговую таблицу с обобщёнными данными по ЧП nCGn в ДНК вирусов, у которых соотношение $[G+C] : [A+T] > 1,0$. В первую очередь это герпесвирусы. Выделены две характеристики: род герпесвирусов *Simplex*, для ДНК вирусов которого характерен $TCGA_{min}$, и симметрия соответствующего профиля. В значительно большей мере эти характеристики отличаются геномы симплексов, точнее цепочки их 1-х (и 3-х) кодонных нуклеотидов.

Возникает вопрос о ДНК с типом АТ и с подобным высоким соотношением $[A+T] : [G+C]$. Среди исследованных нами вирусов такое соотношение большей частью относится к ДНК и геномам поксвирусов. Сходство с герпесвирусами обнаружено только у рисунка симметрий ЧП анализируемых тетрамеров, да и то только когда порядок перебора краевых оснований четвёрки меняется с СТАG на TCGA.

Подытоживая эту часть работы, отметим несколько формальных особенностей тетрамеров TCGA и СТАG в связи со структурой генетического кода.

Центральными тетрамерами 1-х строк октетов каллиграммы А являются TCGA (октет С) и СТАG (октет А).

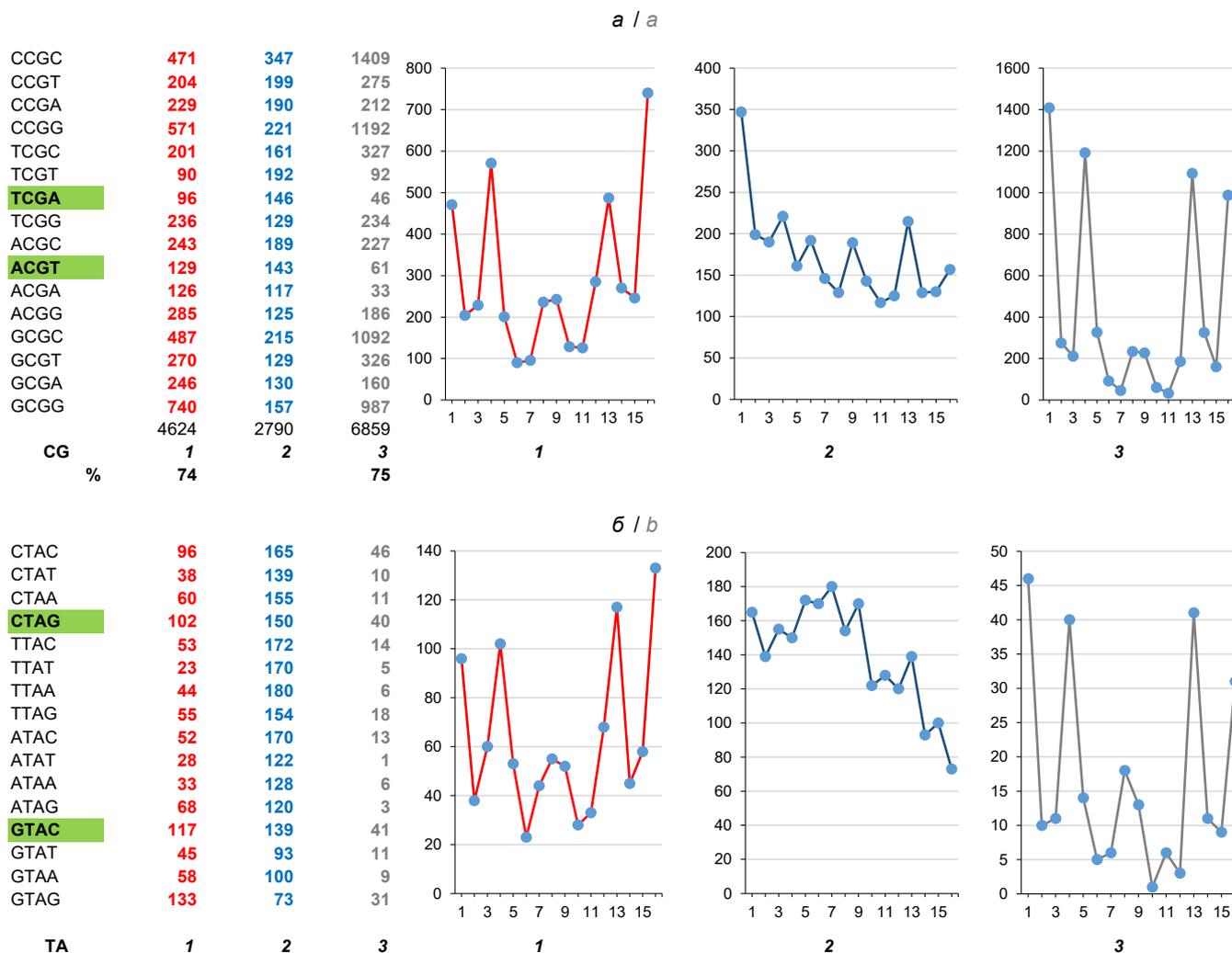


Рис. 5. ЧП тетрамеров nCGn (а) и nTAn (б) в цепочках 1, 2 и 3-х нуклеотидов генома *Herpes simplex virus 1*.

Здесь и на рис. 6, 7: слева — абсолютные значения, справа — их графическое выражение в цепочках 1, 2 и 3-х нуклеотидов, представленное для демонстрации пропорций профиля (но не его масштабов, которые читатель может представить самостоятельно, пользуясь абсолютными значениями цифровой части рисунка).

Fig. 5. FP of nCGn (a) and nTAn (b) tetramers in chains of the 1st, 2nd and 3rd nucleotides of the *Herpes simplex virus 1* genome.

Here and in Fig. 6, 7: on the left — absolute values, on the right — their graphic representation in chains of the 1st, 2nd and 3rd nucleotides to demonstrate proportions of the profile (but not its scale, which can be estimated with the help of absolute values presented in the numeric section of the figure).

ЧП тетрамеров nCGn и nTAn в случае GC-типа генома демонстрирует билатеральную симметрию 1-х и 3-х строк нуклеотидов геномов ряда вирусов и отсутствие такой симметрии в строках 2-х нуклеотидов. Такая построчная особенность характерна и для самого генетического кода. При этом ЧП 3-х строк (G) геномов демонстрируют симметрию при меньших ограничениях $[G+C] : [A+T] > 1$. ЧП 1, 2 и 3-й цепей полной (не ограниченной геномом) ДНК, гены которой не выделены, нивелирует отмеченное различие между цепями генома.

Построчный ЧП nCGn герпесвирусных ДНК выделяет тетрамер TCGA (напомним, что он не является ТН в конечной версии кода) в качестве минимального в строках А и G в большей части ис-

следованных случаев, а построчный ЧП nTAn не выделяет герпесвирусы среди других как группу, уникальную по $STAG_{min}$.

При естественном равенстве размеров всех трех строк вирусного генома (GC тип ДНК) сумма числа тетрамеров nCGn ЧП 1-й и 2-й строк примерно равна числу таких тетрамеров в 3-й строке.

Таким образом, особенности обеих групп функциональных ТН TCGA и STAG, описанных в разделах 2 и 3, объединяет общее свойство — симметрия, выявляемая как в полных вирусных ДНК, так и в отдельных кодонных строках геномов этих вирусов. В первом случае она относится к ДНК «сегодняшних» вирусов, во втором — к их геномам и к самому генетическому коду. Обе группы симмет-

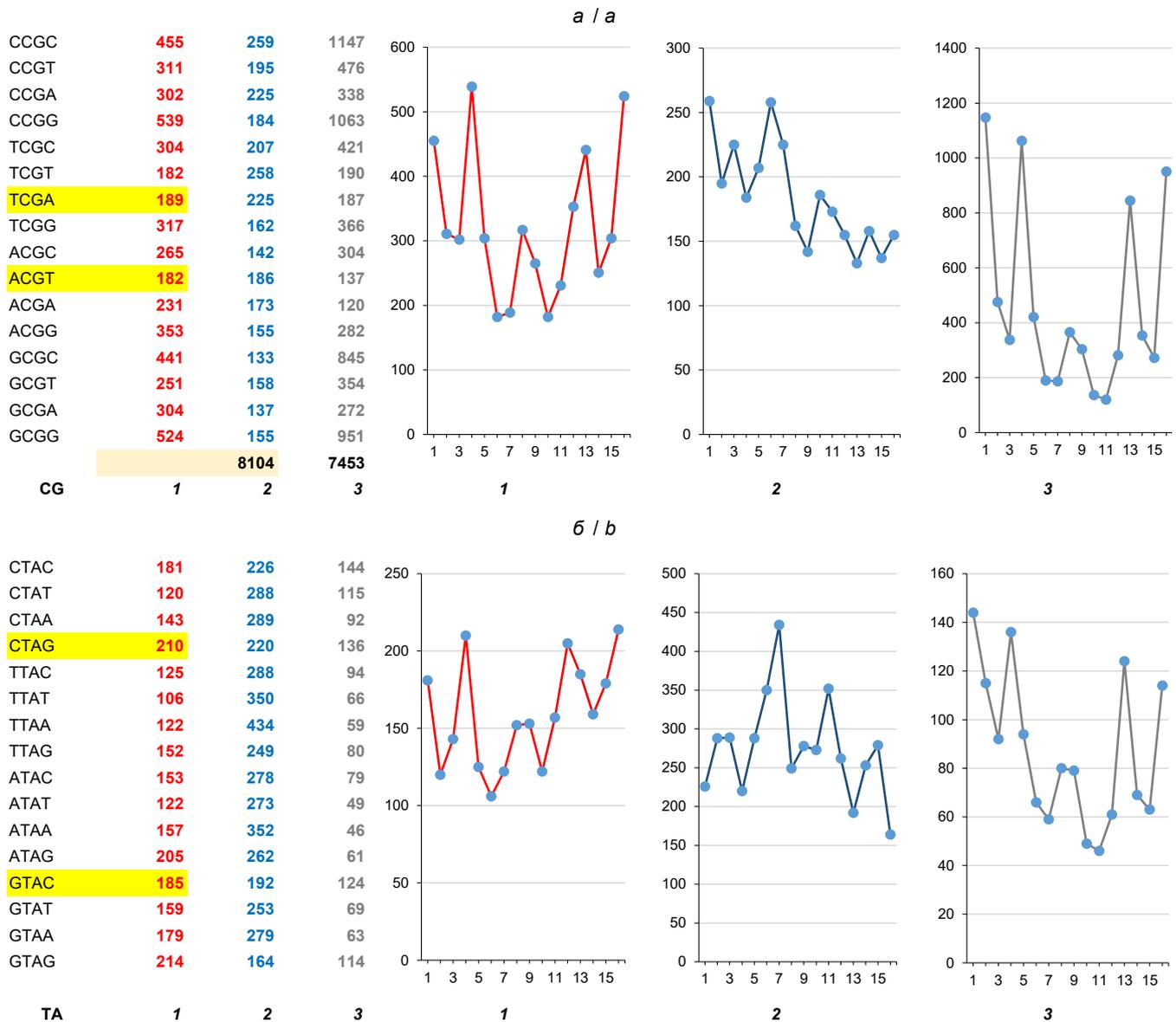


Рис. 6. ЧП тетрамеров nCGn (а) и nTAn (б) в цепочках 1, 2 и 3-х нуклеотидов генома *Human cytomegalovirus* (HHV5).

Fig. 6. FPs of nCGn (a) and nTAn (b) tetramers in chains of the 1st, 2nd and 3rd nucleotides of *Human cytomegalovirus* (HHV5) genome.

рий — и самый их набор — ставят вопрос о происхождении вирусов или хотя бы некоторых из них.

Обсуждение

Жизнь на Земле начиналась с гликозилирования и фосфорилирования пуринов и пиримидинов с последующим отбором однотипных оптических изомеров и их нематричной полимеризацией. Ни один из этих этапов — в известных нам современных естественных условиях на поверхности нашей планеты — практически невозможен без участия ферментов, хотя на ранних этапах абиогенеза в качестве замены такого фермента могли использоваться, например, различные глины [24]. Какое событие и какие условия подготовили здесь (или даже за пре-

делами Земли), запустили и масштабировали этот абиогенетический процесс свыше 4 млрд лет назад — этот вопрос, который остаётся предметом многочисленных спекуляций; вопрос, могло ли это быть случайностью, также пока не имеет ответа [25, 26]. Дальнейшая эволюция могла определяться формированием кластеров микроскопических компартментов (также при участии упомянутых глин), внутри которых происходила конкуренция растущих гетерополимеров за ограниченные ресурсы. «Проигравшие» разрушались и использовались «победителями» либо вытеснялись за пределы компартмента через его полупроницаемую мембрану. И если они успевали, не разрушившись в агрессивной внешней среде, внедриться в ближайший компартмент или оказаться в

CCGC	322	260	494
CCGT	215	216	287
CCGA	269	226	299
CCGG	429	182	513
TCGC	209	191	260
TCGT	151	225	180
TCGA	164	215	190
TCGG	253	178	272
ACGC	294	214	296
ACGT	173	192	218
ACGA	250	188	200
ACGG	341	174	293
GCGC	417	144	402
GCGT	278	158	295
GCGA	301	156	244
GCGG	481	143	422
	1	2	3

CTAC	207	287	205
CTAT	134	254	155
CTAA	128	344	163
CTAG	250	248	227
TTAC	127	239	170
TTAT	112	302	97
TTAA	151	363	122
TTAG	189	250	169
ATAC	186	306	175
ATAT	140	231	127
ATAA	134	319	120
ATAG	210	240	139
GTAC	253	238	228
GTAT	140	200	163
GTAA	167	250	163
GTAG	274	164	215
	1	2	3

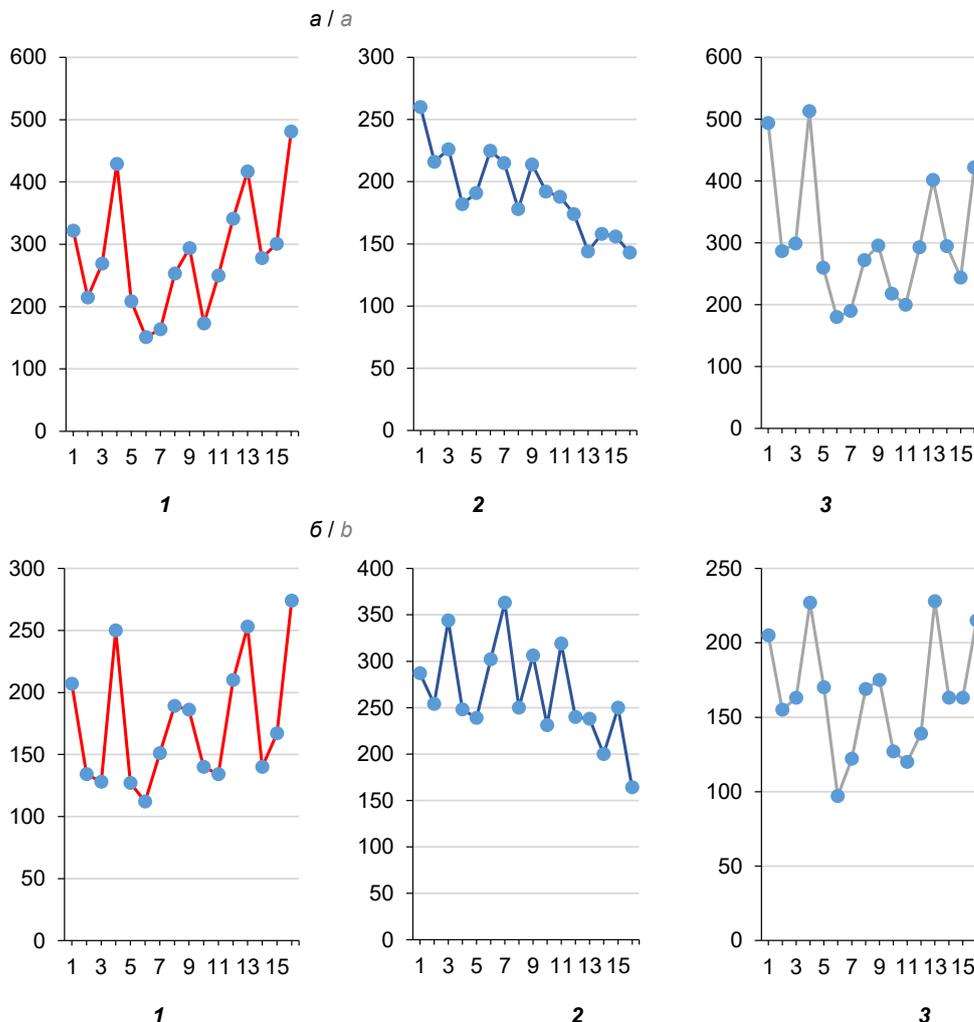


Рис. 7. ЧП тетрамеров nCGn (а) и nTAn (б) в цепочках 1, 2 и 3-х нуклеотидов генома *Ranid herpesvirus 1*.
Fig. 7. FPs of nCGn (a) and nTAn (b) tetramers in chains of the 1st, 2nd and 3rd nucleotides of *Ranid herpesvirus 1* genome.

нём после слияния, то продолжали борьбу за ресурс с новыми конкурентами, которую могли и выиграть. Относительно компартмента поведение этих конкурентов практически не отличалось от поведения сегодняшних вирусов, хотя сам компартмент значительно больше отличался от современной клетки. Преимущество «победителя» определялось в первую очередь скоростью роста, ограниченного допустимым размером, а также формирующейся в этих условиях матричной репликацией, катализируемой рибозимами, продуктами РНК-мира [27, 28], протометаллополипротеинами [29] или случайными факторами.

Описываемые события уже на этом этапе имели две выраженные характеристики жизни: жёсткую конкуренцию участников за ресурсы роста и эволюцию системы, которой требовала такая конкуренция. Устойчивость полимеров могла поддерживать их структура, которая в межрепликационный период делала цепь минимум двойной [30], что — при сохранении её общей длины — укорачивало более чувствительные к повреждениям одноцепочечные участки и формировало множественные повторы, придававшие этой цепи элементы симметрии. Возможно, такая система возникала ненадолго и неоднократно в различных местах планеты, но в конечном счёте она подошла к фундаментальному эволюционному скачку — созданию трансляционной машинерии и генетического кода, которые фиксировали кооперацию нуклеотидных и аминокислотных гетерополимеров и существенно снизили случайность дальнейших процессов на молекулярном уровне.

В нуклеотидных полимерах, способных к росту и репликации, возникла информация, определяющая аминокислотные последовательности, способные катализировать синтетические и репликационные процессы намного эффективней, чем случайные факторы предшествующих этапов.

Генетический код стабилизировал химию жизни и многократно ускорил её эволюцию, приведшую к организации первых клеток и разделившую позиции геномных нуклеиновых кислот на клеточные и

внеклеточные и, таким образом, закрепившую два первых центральных биологических звена, способных к эффективному взаимодействию (конкуренции или кооперации) — клетку и вирус, размеры которых получили возможность существенно вырасти. Вирусы, скорее всего, продолжали образовываться и позднее, и другими путями [31–34].

По мнению некоторых специалистов, генетический код формировался поэтапно [35–38]. Мы предполагаем, что первоначально код сохранял характеристики «до-кодовых» гетерополимеров, именно некоторый избыток G и C, а также элементы симметрии (за счет повторов), придававшие ему помехоустойчивость. В основу симметрии кода легла не только комплементарность, но и другой простой параметр, объединявший кодоны и кодируемые продукты — молекулярная масса (размер) участников. Димер CpG, который, благодаря распространённости, вероятнее всего, стал исходным структурным элементом кода, характеризуется комплементарностью $C \equiv G$ и соотношением $C < G$ ($Y < R$) молекулярных масс мономеров. Вероятно, наличие определённых уникальных функций этого динуклеотида в синтезе биополимеров выделяло его среди других и было как-то причастно к выбору его в качестве исходного. По некоторым предположениям, первые кодоны и были дуплетными [35]. Позднее соотношение $Y < R$ было сохранено, а набор первых нуклеотидов кода был расширен до полной четвёрки — TCGA.

Соотношение $Y < R$ несколько позднее легло в основу сборки другого тетрамера — СТАG, который (уже как ТН) также обладает уникальной биологической функцией. Этот тетрамер детализировал однонаправленность соотношения нуклеотидов с пиримидин-пуринового уровня до уровня нуклеотидов ($C < T < A < G$).

Эволюция размера кодонов привела к возможной на первых этапах взаимной перекрываемости, которая позднее сменилась триплетностью кода с различием функций 1, 2 и 3-х букв кодона. Первые стали обеспечивать стабильность кода на основе симметрии, основанной на последовательном изменении молекулярной массы продуктов кодирования. Аминокислоты, имеющие общий путь биосинтеза, как правило, имеют и общую первую позицию кодонов [25]. Вторые буквы кодирующих триплетов контролируют функции аминокислот на основе их полярности; кодоны аминокислот со схожими физико-химическими свойствами также, как правило, похожи, что смягчает последствия точечных мутаций и нарушений трансляции. Третьи буквы кодонов разделяют кодирующие дуплеты пуринами или пиримидинами (октет А) либо произвольным выбором тех или других (октет С) [23]. Всё это закрепило за обоими тетрамерами принадлежность к различным группам вырожденности, которая сохра-

нялась при расширении за пределы тетрамеров.

Результатом эволюции кода стал предшественник октета С (преобладание С и G), а позднее (или одновременно), когда в код были введены дополнительные характеристики — направление чтения гена и различие кодонов по третьим буквам, пурины или пиримидину, сформировался октет А (компенсаторное преобладание А и T; рис. 4).

Сегодняшние «живые» одноцепочечные нуклеиновые кислоты (отдельные цепи геномов) также отличаются определённой симметрией, включая симметрию описываемых нами ЧП функциональных ТН. Вирусные ДНК — хороший предмет для изучения этой симметрии, поскольку их геном, т.е. набор собственно генов, кодирующих последовательностей, занимает большую часть ДНК (у герпесвирусов, например, свыше 80%).

Мы показали, что в геноме герпесвирусов с большим содержанием GC ЧП nCGn в цепочках 1-х и 3-х нуклеотидов имеет тот же характер симметрий, что и в цепочках 1-х и 3-х нуклеотидов генетического кода. При этом ЧП nCGn в цепочке 2-х кодонных нуклеотидов такой симметрии нет, хотя они имеют те же общие характеристики, что и остальные две цепи, а также общую неразделенную цепь ДНК: тип GC и соотношение $[G+C] : [A+T] > 2$. Различия ЧП nCGn в цепочках 1, 2 и 3-х букв генома соответствуют функциям нуклеотидов кодона и формальной структуре генетического кода. Общее число тетрамеров nЦГн 3-й цепочки в геноме вирусов с большим содержанием GC приблизительно равно сумме общего числа тетрамеров nЦГн 1-й и 2-й цепочек (кодоны октета С — это выбор из 2 в случае первых двух нуклеотидов и выбор из 4 — в случае третьего).

Всё это подчёркивает функциональную характеристику каллиграмм генетического кода, делая их более содержательными, нежели стандартная таблица, варианты которой используются всеми учебниками.

Мы предполагаем, что симметрия ЧП nCGn нуклеотидов третьей цепи — как и общей симметрии ЧП nCGn — может являться атавистической характеристикой «до-кодового» пула полинуклеотидов. С другой стороны, характеристика третьей цепи может требоваться как некий «резерв» для обеспечения симметрии первой. Разумеется, описанные здесь симметрии могли формироваться любыми, даже сгенерированными, как случайные, полимерами ДНК достаточной длины. Однако в таком случае разделение их на три цепочки по описанным выше принципам не могло выделять по таким симметриям вторую цепочку.

Сохранение симметрии ЧП nCGn хотя бы в одной из трех цепочек вирусного генома при его разделении означает, что ограничение на размер генома может — в определённых условиях — быть снижено

примерно в 2–3 раза относительно того, которое мы приняли в начале данной работы (100 т.п.н.).

Разумеется, акцент на герпесвирусах в нашем сообщении (и на аденовирусах также) не означает, что именно с этих вирусов начиналась жизнь на Земле. Для такого предположения эти вирусы, их компоненты (и их хозяева) слишком сложны в структурном и функциональном отношении [18], а их ДНК слишком велика, что показывает, что они прошли длительную эволюцию, которая должна была касаться в том числе их типа (GC) и высокого соотношения GC/AT [39]. Эта эволюция относилась не только к ДНК, но и к продуктам кодирования — белкам, более стабильным компонентам жизни [40, 41]. Именно отдельные белки при сравнении их у различных вирусов показывают эволюционную близость герпесвирусов и хвостатых фагов [42] — при серьёзном эволюционном расхождении структуры ДНК по обсуждаемым здесь параметрам. Роль концевых или внутренних повторов этих ДНК не так очевидна для формирования симметрий, но и они также могут носить атавистический, реликтовый характер.

Симметрии генетического кода обсуждались и прежде, к этой теме исследователи — с самых разных позиций (не только с упомянутых выше) — возвращаются вновь и вновь [43, 44]. Мы рассматриваем здесь частную, но не менее интересную сторону этих симметрий.

Публикуя приведённые данные, мы хотели обратить внимание читателя на характеристики и сходство двух биологических объектов, казалось бы, далеких друг от друга, но обладающих общим весьма выразительным маркером — тетрамерами TCGA и СТАГ и общим свойством ЧП этих тетрамеров — симметриями. Первый такой объект — вирусные (в нашем случае) ДНК, второй — универсальный генетический код. С точки зрения представленных здесь данных, предполагается эволюционная связь между этими объектами, в основе которой лежат не до конца изученные биологические функции этих тетрамеров. Хотя эти функции в биосинтезе ДНК и в процессе формировании кода, на первый взгляд, очень различны, такие различия могут определяться условиями их проявления на различных этапах биологической эволюции.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Филатов Ф.П., Шаргунов А.В. Тетрануклеотидный профиль герпесвирусных ДНК. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(3): 216–26. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-3-3>
2. Tang L., Zhu S., Mastriani E., Fang X., Zhou Y.J., Li Y.G., et al. Conserved intergenic sequences revealed by CTAG-profiling in *Salmonella*: thermodynamic modeling for function prediction. *Sci. Rep.* 2017; 7: 43565. <https://doi.org/10.1038/srep43565>
3. Lundberg P., Welander P., Han X., Cantin E. *Herpes simplex* virus type 1 DNA is immunostimulatory *in vitro* and *in vivo*. *J. Virol.* Oct. 2003; 77(20): 11158–69. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.20.11158-11169.2003>
4. Sharawy M., Louyakis A., Gogarten J.P., May E.R. CTAG vs. GATC: structural basis for representational differences in reverse palindromic DNA tetranucleotide sequences. *Biophys. J.* 2021; 120(3): 222a.
5. Albrecht-Buehler G. Asymptotically increasing compliance of genomes with Chargaff's second parity rules through inversions and inverted transpositions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2006; 103(47): 17828–33. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605553103>
6. Albrecht-Buehler G. The three classes of triplet profiles of natural genomes. *Genomics.* 2007; 89(5): 596–601. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2006.12.009>
7. Zhang S.H., Wang L. A novel common triplet profile for GC-rich prokaryotic genomes. *Genomics.* 2011; 97(5): 330–1. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2011.02.005>
8. Stevens M., Cheng J., Li D., Xi M., Hong C., Maire C., et al. Estimating absolute methylation levels at single-CpG resolution from methylation enrichment and restriction enzyme sequencing methods. *Genome Res.* 2013; 23(9): 1541–53. <https://doi.org/10.1101/gr.152231.112>
9. Krieg A.M., Yi A.K., Matson S., Waldschmidt T.J., Bishop G.A., Teasdale R., et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature.* 1995; 374(6522): 546–9. <https://doi.org/10.1038/374546a0>
10. Fatemi M., Pao M.M., Jeong S., Gal-Yam E.N., Egger G., Weisenberger D.J., et al. Footprinting of mammalian promoters: use of a CpG DNA methyltransferase revealing nucleosome positions at a single molecule level. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33(20): e176. <https://doi.org/10.1093/nar/gni180>
11. Woellmer A., Hammerschmidt W. Epstein–Barr virus and host cell methylation: regulation of latency, replication and virus reactivation. *Curr. Opin. Virol.* 2013; 3(3): 260–5. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.03.005>
12. Burge C., Campbell A.M., Karlin S. Over- and under-representation of short oligonucleotides in DNA sequences. *PNAS.* 1992; 89(4) 1358–62. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.4.1358>
13. Duret L., Galtier N. The covariation between TpA deficiency, CpG deficiency, and G+C content of human isochores is due to a mathematical artifact. *Mol. Biol. Evol.* 2000; 17(11): 1620–5. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a02621>
14. Gori F., Mavroedis D., Jetten M.S.M., Marchiori E. The importance of Chargaff's second parity rule for genomic signatures in metagenomics. *bioRxiv*. Preprint. <https://doi.org/10.1101/146001>
15. Rudner R., Karkas J.D., Chargaff E. Separation of *B. subtilis* DNA into complementary strands, 3 Direct Analysis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1968; 60(3): 921–2. <https://doi.org/10.1073/pnas.60.3.921>
16. Makukov M.A., Shcherbak V.I. The “Wow! signal” of the terrestrial genetic code. *Icarus.* 2013; 224(1): 228–42. <https://doi.org/10.1016/j.icarus.2013.02.017>
17. Filatov F. A molecular mass gradient is the key parameter of the genetic code organization. In: Blaho J., Baines J., eds. *From the Hallowed Halls of Herpesvirology: A Tribute to Bernard Roizman*. World Scientific Publishing Co.; 2012: 155–68. https://doi.org/10.1142/9789814338998_0006
18. Pellett P., Roizman B. Herpesviridae. In: Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013: 1802–2
19. Prabhu V.V. Symmetry observations in long nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res.* 1993; 21(12): 2797–800. <https://doi.org/10.1093/nar/21.12.2797>
20. Forsdyke D.R. Symmetry observations in long nucleotide sequences: a commentary on the discovery note of Qi and Cuticchia. *Bioinformatics.* 2002; 18(1): 215–7. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/18.1.215>

21. Baisnee P.F., Hampson S., Baldi P. Why are complementary strands symmetric? *Bioinformatics*. 2002; 18(8): 1021–33. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/18.8.1021>
22. Румер Ю.Б. О систематизации кодонов в генетическом коде. *Доклады Академии наук СССР*. 1966; 167(6): 1393–4.
23. Волькенштейн М.В., Румер Ю.Б. О систематике кодонов. *Биофизика*. 1967; 12(1): 10–3.
24. Kim H.Y., Cheon J.H., Lee S.H., Min J.Y., Back S.Y., Song J.G., et al. Ternary nanocomposite carriers based on organic clay-lipid vesicles as an effective colon-targeted drug delivery system: preparation and *in vitro/in vivo* characterization. *J. Nanobiotechnology*. 2020; 18(1): 17. <https://doi.org/10.1186/s12951-020-0579-7>
25. Koonin E.V., Novozhilov A.S. Origin and evolution of the genetic code: the universal enigma. *IUBMB Life*. 2009; 61(2): 99–111. <https://doi.org/10.1002/iub.146>
26. Marlaire R., ed. *Ames Research Center. NASA Ames Reproduces the Building Blocks of Life in Laboratory*. Moffett Field, CA: NASA; 2015.
27. Herbert K.M., Nag A. A tale of two RNAs during viral infection: how viruses antagonize mRNAs and small non-coding RNAs in the host cell. *Viruses*. 2016; 8(6): 154. <https://doi.org/10.3390/v8060154>
28. Tjhung K.F., Shokhirev M.N., Horning D.P., Joyce G.F. An RNA polymerase ribozyme that synthesizes its own ancestor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2020; 117(6): 2906–13. <https://doi.org/10.1073/pnas.1914282117>
29. Kim J.D., Senn S., Harel A., Jelen B.I., Falkowski P.G. Discovering the electronic circuit diagram of life: structural relationships among transition metal binding sites in oxidoreductases. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2013; 368(1622): 20120257. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0257>
30. Yakovchuk P., Protozanova E., Frank-Kamenetskii M.D. Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34(2): 564–74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj454>
31. Forterre P. The origin of viruses and their possible roles in major evolutionary transitions. Review. *Virus Res.* 2006; 117: 5–16.
32. Mughal F., Nasir A., Caetano-Anollés G. The origin and evolution of viruses inferred from fold family structure. *Arch. Virol.* 2020; 165(10): 2177–91. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04724-1>
33. Brussow H., Kutter E. Genomics and evolution of tailed phages. In: Kutter E., Sulakvelidze A. eds. *Bacteriophages: Biology and Applications*. Boca Raton, London, New York, Washington: CRC press; 2005: 129–64.
34. Abedon S.T. Phage evolution and ecology. *Adv. Appl. Microbiol.* 2009; 67: 1–45. [https://doi.org/10.1016/s0065-2164\(08\)01001-0](https://doi.org/10.1016/s0065-2164(08)01001-0)
35. Altstein A.D. The progene hypothesis: the nucleoprotein world and how life began. *Biol. Direct*. 2015; 10: 67. <https://doi.org/10.1186/s13062-015-0096-z>
36. Di Giulio M. The origin of the genetic code: theories and their relationships, a review. *Biosystems*. 2005; 80(2): 175–84. <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2004.11.005>
37. Gilis D., Massar S., Cerf N.J., Rooman M. Optimality of the genetic code with respect to protein stability and amino-acid frequencies. *Genome Biol.* 2001; 2(11): RESEARCH0049. <https://doi.org/10.1186/gb-2001-2-11-research0049>
38. Wetzel R. Evolution of the aminoacyl-tRNA synthetases and the origin of the genetic code. *J. Mol. Evol.* 1995; 40(5): 545–50. <https://doi.org/10.1007/bf00166624>
39. McGeoch J., Rixon F.J., Davison A.J. Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res.* 2006; 117(1): 90–104. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.01.002>
40. Wang N., Baldi P.F., Gaut B.S. Phylogenetic analysis, genome evolution and the rate of gene gain in the *Herpesviridae*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2007; 43(3): 1066–75. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.11.019>
41. Wertheim J.O., Smith M.D., Smith D.M., Scheffler K., Kosakovsky Pond S.L. Evolutionary origins of human herpes simplex viruses 1 and 2. *Mol. Biol. Evol.* 2014; 31(9): 2356–64. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu185>
42. Baker M.L., Jiang W., Rixon F.J., Chiu W. Common ancestry of herpesviruses and tailed DNA bacteriophages. *J. Virol.* 2005; 79(23): 14967–70. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.23.14967-14970.2005>
43. Гупал А.М., Гупал Н.А., Островский А.В. Симметрия и свойства записи генетической информации в ДНК. *Проблемы управления и информатики*. 2011; 5(3): 120–7.
44. Сергиенко И.В., Гупал А.М., Вагис А.А. Симметричный код и генетические мутации. *Кибернетика и системный анализ*. 2016; (2): 73–80.

REFERENCES

1. Filatov F.P., Shargunov A.V. Tetranucleotide profile of herpesvirus DNA. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(3): 216–26. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-3-3> (in Russian)
2. Tang L., Zhu S., Mastriani E., Fang X., Zhou Y.J., Li Y.G., et al. Conserved intergenic sequences revealed by CTAG-profiling in *Salmonella*: thermodynamic modeling for function prediction. *Sci. Rep.* 2017; 7: 43565. <https://doi.org/10.1038/srep43565>
3. Lundberg P., Welander P., Han X., Cantin E. *Herpes simplex virus type 1 DNA is immunostimulatory in vitro and in vivo*. *J. Virol.* Oct. 2003; 77(20): 11158–69. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.20.11158-11169.2003>
4. Sharawy M., Louyakis A., Gogarten J.P., May E.R. CTAG vs. GATC: structural basis for representational differences in reverse palindromic DNA tetranucleotide sequences. *Biophys. J.* 2021; 120(3): 222a.
5. Albrecht-Buehler G. Asymptotically increasing compliance of genomes with Chargaff's second parity rules through inversions and inverted transpositions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2006; 103(47): 17828–33. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605553103>
6. Albrecht-Buehler G. The three classes of triplet profiles of natural genomes. *Genomics*. 2007; 89(5): 596–601. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2006.12.009>
7. Zhang S.H., Wang L. A novel common triplet profile for GC-rich prokaryotic genomes. *Genomics*. 2011; 97(5): 330–1. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2011.02.005>
8. Stevens M., Cheng J., Li D., Xi M., Hong C., Maire C., et al. Estimating absolute methylation levels at single-CpG resolution from methylation enrichment and restriction enzyme sequencing methods. *Genome Res.* 2013; 23(9): 1541–53. <https://doi.org/10.1101/gr.152231.112>
9. Krieg A.M., Yi A.K., Matson S., Waldschmidt T.J., Bishop G.A., Teasdale R., et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*. 1995; 374(6522): 546–9. <https://doi.org/10.1038/374546a0>
10. Fatemi M., Pao M.M., Jeong S., Gal-Yam E.N., Egger G., Weisenberger D.J., et al. Footprinting of mammalian promoters: use of a CpG DNA methyltransferase revealing nucleosome positions at a single molecule level. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33(20): e176. <https://doi.org/10.1093/nar/gni180>
11. Woellmer A., Hammerschmidt W. Epstein-Barr virus and host cell methylation: regulation of latency, replication and virus reactivation. *Curr. Opin. Virol.* 2013; 3(3): 260–5. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.03.005>
12. Burge C., Campbell A.M., Karlin S. Over- and under-representation of short oligonucleotides in DNA sequences. *PNAS*. 1992; 89(4): 1358–62. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.4.1358>
13. Duret L., Galtier N. The covariation between TpA deficiency, CpG deficiency, and G+C content of human isochores is due to a mathematical artifact. *Mol. Biol. Evol.* 2000; 17(11): 1620–5. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a02621>

14. Gori F., Mavroicidis D., Jetten M.S.M., Marchiori E. The importance of Chargaff's second parity rule for genomic signatures in metagenomics. *bioRxiv*. Preprint. <https://doi.org/10.1101/146001>
15. Rudner R., Karkas J.D., Chargaff E. Separation of *B. subtilis* DNA into complementary strands, 3 Direct Analysis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1968; 60(3): 921–2. <https://doi.org/10.1073/pnas.60.3.921>
16. Makukov M.A., Shcherbak V.I. The “Wow! signal” of the terrestrial genetic code. *Icarus*. 2013; 224(1): 228–42. <https://doi.org/10.1016/j.icarus.2013.02.017>
17. Filatov F. A molecular mass gradient is the key parameter of the genetic code organization. In: Blaho J., Baines J., eds. *From the Hallowed Halls of Herpesvirology: A Tribute to Bernard Roizman*. World Scientific Publishing Co.; 2012: 155–68. https://doi.org/10.1142/9789814338998_0006
18. Pellett P., Roizman B. Herpesviridae. In: Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013: 1802–2
19. Prabhu V.V. Symmetry observations in long nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res*. 1993; 21(12): 2797–800. <https://doi.org/10.1093/nar/21.12.2797>
20. Forsdyke D.R. Symmetry observations in long nucleotide sequences: a commentary on the discovery note of Qi and Cuticchia. *Bioinformatics*. 2002; 18(1): 215–7. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/18.1.215>
21. Baisnee P.F., Hampson S., Baldi P. Why are complementary strands symmetric? *Bioinformatics*. 2002; 18(8): 1021–33. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/18.8.1021>
22. Rumer Yu.B. On codon systematization in the genetic code. *Doklady Akademii nauk SSSR*. 1966; 167(6): 1393–4. (in Russian)
23. Vol'kenshtein M.V., Rumer Yu.B. Systematics of codons. *Biofizika*. 1967; 12(1): 10–3.
24. Kim H.Y., Cheon J.H., Lee S.H., Min J.Y., Back S.Y., Song J.G., et al. Ternary nanocomposite carriers based on organic clay-lipid vesicles as an effective colon-targeted drug delivery system: preparation and *in vitro/in vivo* characterization. *J. Nanobiotechnology*. 2020; 18(1): 17. <https://doi.org/10.1186/s12951-020-0579-7>
25. Koonin E.V., Novozhilov A.S. Origin and evolution of the genetic code: the universal enigma. *IUBMB Life*. 2009; 61(2): 99–111. <https://doi.org/10.1002/iub.146>
26. Marlaire R., ed. *Ames Research Center. NASA Ames Reproduces the Building Blocks of Life in Laboratory*. Moffett Field, CA: NASA; 2015.
27. Herbert K.M., Nag A. A tale of two RNAs during viral infection: how viruses antagonize mRNAs and small non-coding RNAs in the host cell. *Viruses*. 2016; 8(6): 154. <https://doi.org/10.3390/v8060154>
28. Tjhung K.F., Shokhiev M.N., Horning D.P., Joyce G.F. An RNA polymerase ribozyme that synthesizes its own ancestor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2020; 117(6): 2906–13. <https://doi.org/10.1073/pnas.1914282117>
29. Kim J.D., Senn S., Harel A., Jelen B.I., Falkowski P.G. Discovering the electronic circuit diagram of life: structural relationships among transition metal binding sites in oxidoreductases. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B. Biol. Sci*. 2013; 368(1622): 20120257. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0257>
30. Yakovchuk P., Protozanova E., Frank-Kamenetskii M.D. Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix. *Nucleic Acids Res*. 2006; 34(2): 564–74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj454>
31. Forterre P. The origin of viruses and their possible roles in major evolutionary transitions. *Review. Virus Res*. 2006; 117: 5–16.
32. Mughal F., Nasir A., Caetano-Anollés G. The origin and evolution of viruses inferred from fold family structure. *Arch. Virol*. 2020; 165(10): 2177–91. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04724-1>
33. Brussow H., Kutter E. Genomics and evolution of tailed phages. In: Kutter E., Sulakvelidze A. eds. *Bacteriophages: Biology and Applications*. Boca Raton, London, New York, Washington D.C.: CRC press; 2005: 129–64.
34. Abedon S.T. Phage evolution and ecology. *Adv. Appl. Microbiol*. 2009; 67: 1–45. [https://doi.org/10.1016/s0065-2164\(08\)01001-0](https://doi.org/10.1016/s0065-2164(08)01001-0)
35. Altstein A.D. The progene hypothesis: the nucleoprotein world and how life began. *Biol. Direct*. 2015; 10: 67. <https://doi.org/10.1186/s13062-015-0096-z>
36. Di Giulio M. The origin of the genetic code: theories and their relationships, a review. *Biosystems*. 2005; 80(2): 175–84. <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2004.11.005>
37. Gilis D., Massar S., Cerf N.J., Rooman M. Optimality of the genetic code with respect to protein stability and amino-acid frequencies. *Genome Biol*. 2001; 2(11): RESEARCH0049. <https://doi.org/10.1186/gb-2001-2-11-research0049>
38. Wetzel R. Evolution of the aminoacyl-tRNA synthetases and the origin of the genetic code. *J. Mol. Evol*. 1995; 40(5): 545–50. <https://doi.org/10.1007/bf00166624>
39. McGeoch J., Rixon F.J., Davison A.J. Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res*. 2006; 117(1): 90–104. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.01.002>
40. Wang N., Baldi P.F., Gaut B.S. Phylogenetic analysis, genome evolution and the rate of gene gain in the *Herpesviridae*. *Mol. Phylogenet. Evol*. 2007; 43(3): 1066–75. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.11.019>
41. Wertheim J.O., Smith M.D., Smith D.M., Scheffler K., Kosakovsky Pond S.L. Evolutionary origins of human herpes simplex viruses 1 and 2. *Mol. Biol. Evol*. 2014; 31(9): 2356–64. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu185>
42. Baker M.L., Jiang W., Rixon F.J., Chiu W. Common ancestry of herpesviruses and tailed DNA bacteriophages. *J. Virol*. 2005; 79(23): 14967–70. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.23.14967-14970.2005>
43. Gupal A.M., Gupal N.A., Ostrovskiy A.V. Symmetry and properties of recording genetic information in DNA. *Problemy upravleniya i informatiki*. 2011; 5(3): 120–7. (in Russian)
44. Sergienko I.V., Gupal A.M., Vagis A.A. Symmetric code and genetic mutations. *Kibernetika i sistemnyy analiz*. 2016; (2): 73–80. (in Russian)

Информация об авторе

Филатов Феликс Петрович[✉] — д.б.н., в.н.с. лаб. молекулярной биотехнологии отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия; в.н.с. отдела эпидемиологии НИЦЭИМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, felix001@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-6182-2241>

Статья поступила в редакцию 07.05.2022;
принята к публикации 30.06.2022;
опубликована 30.07.2022

Information about the authors

Felix P. Filatov[✉] — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of molecular biotechnology, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia; leading researcher, Department of epidemiology, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, felix001@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-6182-2241>

The article was submitted 07.05.2022;
accepted for publication 30.06.2022;
published 30.07.2022

НЕКРОЛОГИ



Памяти Айрата Радиковича Мавзютова (3 февраля 1962 года – 28 июля 2022 года)



28 июля 2022 года после непродолжительной тяжёлой болезни на 61-м году ушёл из жизни замечательный человек, наш дорогой коллега — член редакционного совета журнала «Клиническая лабораторная диагностика», заведующий кафедрой фундаментальной и прикладной микробиологии, профессор кафедры лабораторной диагностики института последиplomного образования (ИДПО) ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, заслуженный деятель науки Республики Башкортостан, академик РАМТН, доктор медицинских наук профессор **Айрат Радикович Мавзютов**.

Айрат Радикович родился в 1962 г. в Уфе. В 1985 г. с отличием закончил Башкирский государственный медицинский институт имени XV-летия ВЛКСМ по специальности «Гигиена, эпидемиология, санитария», в 1988 г. — аспирантуру на кафедре микробиологии БГМИ с защитой кандидатской диссертации на тему «Адгезивная и цитотоксическая активность кишечных и кишечногоподобных иерсиний». С 1988 г. на протяжении 33 лет Айрат Радикович работал в БГМИ (впоследствии БГМУ) в должности ассистента, старшего преподавателя, доцента кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии; доцента и профессора кафедры лабораторной диагностики ИДПО БГМУ. В 2001 г. защитил диссертацию на соискание учёной степени доктора медицинских наук на тему «Молекулярно-генетические основы токсигенности условно-патогенных представителей *Enterobacteriaceae*».

В 1997 г. ему было присвоено учёное звание доцента, в 2004 г. — профессора.

В 2005 г. А.Р. Мавзютов организовал кафедру фундаментальной и клинической микробиологии, которой бессменно руководил до конца жизни. На кафедре фундаментальной и клинической микробиологии — в то время единственной среди медицинских вузов и факультетов России — велась подготовка специалистов с высшим профессиональным образованием по специальности 020209 «Микробиология». С 2012 г. сотрудники кафедры осуществляют подготовку студентов по направлению 06.03.01 «Биология» в рамках программ бакалавриата, с 2018 г. — магистратуры. Кафедра неоднократно становилась лучшей по итогам научной и инновационной деятельности, студенты и аспиранты кафедры награждались дипломами на конкурсах молодёжных проектов и получали федеральные научные гранты.

Профессор А.Р. Мавзютов стоял у истоков организации в БГМУ ординатуры, переподготовки и повышения квалификации врачей по специальности «Бактериология» и биологов бактериологических лабораторий, будучи до последнего времени куратором этого направления на кафедре лабораторной диагностики ИДПО БГМУ. Он являлся членом рабочей группы Федерального учебно-методического объединения Минздрава России по преподаванию микробиологии, внёс большой вклад в появление новой специальности «Медицинская микробиология», разработку профессионального стандарта и программ подготовки кадров. У Айрата Радиковича были большие планы и огромное желание в дальнейшем развивать новую специальность в России.

Айрат Радикович являлся руководителем научной школы «Микробиология и молекулярная диагностика», вёл активную научную работу, воспитал плеяду научных и педагогических кадров. Он был внимательным, заботливым руководителем, человеком энциклопедических знаний. Область научных интересов Айрата Радиковича охватывала патологические и пограничные состояния, ассоциированные с липополисахаридами грамотрицательных бактерий, острые кишечные инфекции и заболевания мочевого тракта, вызванные условно-патогенными энтеробактериями, молекулярно-генетические и масс-спектрометрические аспекты детекции

НЕКРОЛОГИ

и идентификации возбудителей внебольничной пневмонии, урогенитального трихомониаза и других инфекций, совершенствование технологии ПЦР (селективная амплификация) и создание молекулярно-генетических тест-систем для ранней диагностики и оценки эффективности лечения воспалительных заболеваний и многое другое, связанное с патогенетически обоснованными методами лабораторной диагностики в клинической микробиологии. А.Р. Мавзютовым и его последователями предложена оригинальная классификация вагинальных дисбиозов, разработаны клинические и лабораторные критерии дифференцировки и оценки эффективности терапии. Айрат Радикович — автор 260 научных работ, в том числе учебников, учебных пособий, руководств для врачей, монографий, 27 изобретений и рационализаторских предложений.

Много времени и сил профессор А.Р. Мавзютов отдавал подготовке кадров высшей квалификации. Он работал заместителем директора по клинической ординатуре и интернатуре ИДПО БГМУ, в 2006–2012 гг. — деканом медико-профилактического факультета с отделением микробиологии. А.Р. Мавзютов был членом диссертационных советов по биотехнологии и нанобиотехнологии, экологии, микробиологии, аллергологии и клинической иммунологии, научным руководителем 15 кандидатских диссертаций.

Профессор А.Р. Мавзютов являлся действительным членом Академии медико-технических

наук России по отделению медицинской экологии, биотехнологии и промышленности, членом Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, председателем Башкирского отделения Всероссийского научного общества биотехнологов им. Ю.А. Овчинникова, членом научно-практического общества бактериологов.

В 2009 г. Айрат Радикович был приглашён профессором В.В. Меньшиковым в редакционный совет журнала «Клиническая лабораторная диагностика» и стал его активным членом.

За успехи в педагогической, научной и научно-организационной работе профессор А.Р. Мавзютов отмечен благодарностями Министра здравоохранения РФ. Айрат Радикович — лауреат республиканского конкурса «Лучший врач года» в номинации «За вклад в развитие медицины, внесённый представителями фундаментальной науки». В 2009 г. ему было присвоено почетное звание «Заслуженный деятель науки Республики Башкортостан».

Трудно смириться с утратой для отечественной науки этого Человека, Гражданина, Профессионала, для которого Отчизна, Честь, Достоинство, Благородство, Честность, Любовь к своему делу были не просто словами.

Редакция журнала глубоко скорбит о потере прекрасного человека, талантливого педагога, видного учёного и искренне соболезнует родным, близким, ученикам и коллегам Айрата Радиковича.

ЮБИЛЕИ



К 85-летию академика РАН Олега Валерьевича Бухарина



16 сентября 2022 года исполняется 85 лет академику РАН, заслуженному деятелю науки РФ, лауреату премии Правительства РФ, доктору медицинских наук, профессору, научному руководителю Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН, ведущему специалисту в области микробиологии **Бухарину Олегу Валерьевичу**.

Олег Валерьевич Бухарин — видный российский учёный, известный своими научными трудами в области медицинской микробиологии, обосновавший новое направление науки — инфекционную симбиологию.

О.В. Бухарин родился в 1937 г. в Челябинске. После успешного окончания Челябинского медицинского института подготовил и защитил в 1963 г. кандидатскую диссертацию на тему «Материалы по изучению защитного неспецифического действия витамина B_{12} в инфекционном процессе», а в 1969 г. докторскую диссертацию «Лекарственное стимулирование естественной сопротивляемости организма к инфекции». С 1968 г. он более 45 лет заведовал кафедрой микробиологии в Оренбургском медицинском институте, возглавлял этот институт в 1977–1980 гг., был депутатом Верховного Совета РСФСР (1975–1980). В 1990 г. организовал лабораторию, преобразованную далее в отдел, а в

1996 г. — в Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, став его первым директором.

Изучая взаимодействие возбудителя инфекции и хозяина, О.В. Бухарин обосновал положение о персистенции как форме симбиоза и определил важнейшую роль пептидогликана бактерий в качестве «биомишени» для системы иммунитета, что открыло доступ к изучению механизмов сохранения патогенных микроорганизмов в организме человека.

Работы О.В. Бухарина показали, что организм человека находится с микроорганизмами в «союзе, неотделимом от вражды», сформировавшемся в процессе многовековой эволюции. Собственная микрофлора, оказывая безусловную пользу и помогая организовать защиту от опасных патогенов, не всегда боится от внезапной атаки других вирулентных представителей микромира. Для всестороннего исследования данного феномена потребовались значительные усилия по изучению факторов «агрессии» возбудителей болезни микробиологами и определения иммунологами защитных ресурсов самого человека. О.В. Бухарин обосновал, что изучение взаимоотношений «патоген–хозяин» следует осуществлять, используя симбиотический подход, т.е. рассматривая симбиоз как биологическую основу инфекции. При этом микробиоценоз

ЮБИЛЕИ

анализируется с позиций ассоциативного симбиоза — многокомпонентной интегральной системы, включающей хозяина в качестве макропартнёра, стабильных доминантных микросимбионтов и ассоциативных микросимбионтов с разнонаправленными воздействиями. В результате масштабных исследований патогенного и персистентного потенциала микробиоты О.В. Бухариным получены новые фундаментальные знания о механизмах управления в системе «паразит–хозяин». На модели кишечной микробиоты разработан новый метод межмикробного распознавания «свой–чужой» в паре «доминант–ассоциант», благодаря чему выделены новые высокоэффективные пробиотические штаммы бактерий, составлены новые пробиотические композиции и лекарственные препараты. Под руководством О.В. Бухарина разработан новый способ определения биосовместимости бифидобактерий и определена их роль в формировании кишечного гомеостаза.

Свидетельством плодотворной научной деятельности О.В. Бухарина являются 560 научных публикаций, в том числе 25 монографий, 2 учебника для студентов по медицинской микробиологии, более 120 патентов и изобретений. Под его руководством выполнено и защищено 34 докторских и 120 кандидатских диссертаций медико-биологического профиля. Важнейшая роль О.В. Бухарина во внедрении фундаментальных научных идей в практические разработки в области медицины и экологии отмечена двумя премиями Правительства РФ (2003,

2010). Его оригинальные и глубокие разработки в области инфектологии, развивающие идеи отечественных ученых, были отмечены академическим сообществом, в частности, орденом М.В. Ломоносова, премией РАН по биологии им. И.И. Мечникова, премией РАМН по микробиологии им. В.Д. Тимакова, премиями УрО РАН им. В.В. Парина и им. С.С. Шварца. Яркая и результативная деятельность О.В. Бухарина в научной, педагогической и общественной сферах отмечена государственными наградами: орденами «За заслуги перед Отечеством» III и IV степени, орденом «Почётный гражданин России», золотой медалью и Дипломом почёта ВДНХ СССР; серебряной медалью ВДНХ СССР, медалью «За трудовую доблесть», золотой медалью им. И.И. Мечникова Союза физиологических обществ стран СНГ и медалями Болгарии.

Много времени О.В. Бухарин уделяет консолидации научных сил в Оренбуржье, являясь организатором Оренбургского федерального исследовательского центра РАН. Его работы неоднократно удостоены премий Правительства и Губернатора Оренбургской области, а он сам является Почётным гражданином города Оренбурга.

О.В. Бухарин — член президиума Уральского отделения РАН, член редколлегии «Журнала микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии». Широкий кругозор и огромная эрудиция академика О.В. Бухарина в сочетании с высокой творческой активностью и трудолюбием позволяют ему оставаться признанным лидером и авторитетом в науке.

Редколлегия журнала, коллеги и ученики сердечно поздравляют юбиляра и желают ему здоровья и дальнейших творческих успехов!

Уважаемые коллеги!

26–28 октября 2022 г. в Москве состоится

XII Съезд Общероссийской общественной организации «Всероссийское научно-практическое общество эпидемиологов, микробиологов и паразитологов»

В программу Съезда включены следующие научные направления:

- теоретические аспекты эпидемиологии;
- совершенствование эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями;
- санитарная охрана территории Российской Федерации и международное сотрудничество;
- современные методы медицинской микробиологии в системе эпидемиологического надзора;
- молекулярная диагностика и биоинформатика в обеспечении эпидемиологического благополучия населения;
- современные методы и средства дезинфекции;
- болезни, общие для человека и животных, — межведомственная проблема; природно-очаговые инфекции в системе биологической безопасности, преодоление межвидовых барьеров;
- современные аспекты паразитологии;
- эпидемиологические аспекты новой коронавирусной инфекции;
- противоэпидемические мероприятия при геморрагических лихорадках;
- эпидемиология и профилактика острых респираторных вирусных инфекций, гриппа и пневмоний;
- эпидемиологический надзор за ВИЧ-инфекцией;
- эпидемиологический надзор и профилактика инфекций с фекально-оральным механизмом передачи возбудителя;
- вакцинопрофилактика новой коронавирусной инфекции;
- неспецифическая профилактика новой коронавирусной инфекции (в том числе режимно-ограничительные и санитарно-гигиенические мероприятия, цифровые и медиакоммуникационные технологии, неспецифическая иммунопрофилактика);
- эпидемиологическая значимость антимикробной резистентности;

- эпидемиологический надзор за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи;
- риск-ориентированные технологии и противоэпидемическая защита медицинских работников в процессе профессиональной деятельности;
- прогнозирование и эпидемиологическая оценка биологических рисков;
- правовое обеспечение эпидемиологического благополучия;
- BIG DATA и технологии искусственного интеллекта в эпидемиологии;
- разработка отечественных технологий создания вакцин и иммунобиологических препаратов для профилактики инфекционных заболеваний у детей и взрослых (без терапевтических вакцин);
- вакциноуправляемые инфекции в условиях пандемии COVID-19;
- противодействие антивакцинальной пропаганде — ответственность медицинских работников.

К участию в работе Съезда приглашается широкий круг специалистов, вовлечённых в изучение и решение проблем эпидемиологии, диагностики, лечения и профилактики инфекционных и паразитарных болезней: врачи-эпидемиологи, инфекционисты, паразитологи, микробиологи, клинические фармакологи, специалисты по клинической лабораторной диагностике, дезинфектологи, организаторы здравоохранения в соответствии с квотами, указанными в Приказе Роспотребнадзора № 122 от 22.03.2022.

В рамках Съезда организуется работа выставочной экспозиции с участием ведущих компаний — производителей лекарственных средств, медицинского и лабораторного оборудования, расходных материалов, профильных медицинских организаций.

**Предварительная регистрация делегатов —
до 15 октября 2022 г.**

Контактные данные Оргкомитета

Осокина Ольга Владимировна — учёный секретарь ВНПОЭМиП.
Тел.: +7(925)011-87-79; E-mail: ov-osokina@yandex.ru

Сайт Съезда: **СЪЕЗД-ВНОЭМП.РФ**